

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

|   |  |
|---|--|
| Date d'expédition (jour/mois/année)<br>20 juin 2000 (20.06.00)              |  |
| Demande internationale no<br>PCT/FR99/02635                                 | Référence du dossier du déposant ou du mandataire<br>CMGrm644/38 |
| Date du dépôt international (jour/mois/année)<br>28 octobre 1999 (28.10.99) | Date de priorité (jour/mois/année)<br>30 octobre 1998 (30.10.98) |
| Déposant<br>VIJAYALAKSHMI, Mookambeswaran etc                               |  |

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

23 mai 2000 (23.05.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

R. Forax

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|   |           |   |
|---|-----------|---|
| <b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b><br><b>B01J 20/32, B01D 15/08, A61M 1/36</b>  | <b>A1</b> | <b>(11) Numéro de publication internationale: WO 00/25911</b><br><b>(43) Date de publication internationale: 11 mai 2000 (11.05.00)</b>   |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/02635<br><b>(22) Date de dépôt international:</b> 28 octobre 1999 (28.10.99)<br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b><br>98/13655 30 octobre 1998 (30.10.98) FR<br><b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 Rue Michel Ange, F-75794 Paris (FR).<br><b>(72) Inventeurs; et</b><br><b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> VIJAYALAKSHMI, Mookambeswaran [FR/FR]; 5 Square Charles Gounot, F-60200 Compiègne (FR). PITIOT, Olivier [FR/FR]; 5 Rue de l'Intendance, F-02200 Soissons (FR). LEGALLAIS, Cécile [FR/FR]; 15 Rue du Château d'eau, F-60340 Villers sous Saint Leu (FR). MORINIERE, Philippe [FR/FR]; 102 Avenue Foy, F-80000 Amiens (FR).<br><b>(74) Mandataires:</b> ORES, Béatrice etc.; Cabinet Ores, 6 Avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). |           | <b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><br><b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.</i><br><i>Avec revendications modifiées.</i> |
| <b>(54) Title: USE OF AN ADSORBENT GEL FOR ELIMINATING AND PURIFYING BIOMOLECULES</b><br><b>(54) Titre: UTILISATION D'UN GEL ADSORBANT POUR ELIMINER ET PURIFIER LES BIOMOLECULES</b>   |           |   |
| <b>(57) Abstract</b><br><p>The invention concerns the use of an adsorptive size exclusion chromatography gel, said gel essentially consisting of a polysaccharide matrix whereon is grafted a polymer coupled with an affinity ligand and having a cleavage threshold ranging between 2 kDa and 60 kDa for eliminating and purifying biomolecules.</p> <b>(57) Abrégé</b><br><p>L'invention concerne l'utilisation d'un gel adsorbant alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel consistant essentiellement en une matrice de polysaccharide sur laquelle est greffé un polymère couplé à un ligand d'affinité et ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa, pour éliminer et purifier des biomolécules.</p>   |           |   |

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |   |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                       | LS | Lesotho                                  | SI | Slovénie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                      | LT | Lituanie                                 | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France  | LU | Luxembourg                               | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon   | LV | Lettonie                                 | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïdjan               | GB | Royaume-Uni                                   | MC | Monaco                                   | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie-Herzégovine        | GE | Géorgie                                       | MD | République de Moldova                    | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana   | MG | Madagascar                               | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée  | MK | Ex-République yougoslave<br>de Macédoine | TM | Turkménistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce   | ML | Mali                                     | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                       | MN | Mongolie                                 | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | MR | Mauritanie                               | UA | Ukraine               |
| BR | Bésil                     | IL | Israël  | MW | Malawi                                   | UG | Ouganda               |
| BY | Bélarus                   | IS | Islande                                       | MX | Mexique                                  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie  | NE | Niger                                    | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon   | NL | Pays-Bas                                 | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya   | NO | Norvège                                  | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                                  | NZ | Nouvelle-Zélande                         | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire<br>démocratique de Corée | PL | Pologne                                  |    |                       |
| CM | Cameroun                  | KR | République de Corée                           | PT | Portugal                                 |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakstan                                     | RO | Roumanie                                 |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                                  | RU | Fédération de Russie                     |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                                 | SD | Soudan                                   |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                     | SE | Suède                                    |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                       | SG | Singapour                                |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |   |    |  |    |                       |

## UTILISATION D'UN GEL ADSORBANT POUR ELIMINER ET PURIFIER LES BIOMOLECULES

La présente invention est relative à l'utilisation d'un gel adsorbant alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité (gel AdSEC, pour "*Adsorptive Size Exclusion Chromatography*").

Le principe d'un gel AdSEC résulte de la fusion de deux techniques chromatographiques : exclusion de taille et affinité, afin d'obtenir des supports alliant les propriétés les plus intéressantes de ces dernières.

La chromatographie d'exclusion de taille (filtration sur gel) permet la séparation des molécules en fonction de leur seul encombrement stérique lors de leur diffusion passive dans un tamis moléculaire (gel). Les plus grosses molécules ne peuvent pénétrer la matrice réticulée et sont par conséquent exclues plus rapidement de la colonne. Cette technique possède la particularité de ne pas présenter d'interactions entre le support et les molécules, donc d'être relativement peu sensible aux conditions biochimiques (pH, force ionique) de la solution. En revanche, du fait de son principe de diffusion, les facteurs limitants de son utilisation sont généralement un temps de manipulation important (car on utilise des débits faibles), ainsi qu'un dépôt d'échantillons relativement restreint (1 à 5 % du volume de la colonne).

La chromatographie d'affinité repose sur des interactions moléculaires entre le support (matrice sur laquelle on greffe des ligands d'affinité) et les molécules à séparer. Parmi ces ligands d'affinité, les ions métalliques immobilisés, introduits en 1975 par Porath *et al.* (Nature, 1975, 21, 598-599), représentent une méthode de séparation basée sur les interactions (liaisons de coordination) entre des biomolécules en solution et des ions métalliques immobilisés sur un support ; les ions Zn(II), Cu(II), Ni(II) et Co(II) sont les plus couramment utilisés. On parle de chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC).

L'utilisation conjointe des principes des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité (AdSEC) a été discutée par Porath *et al.* (Int. J. of Bio-Chromatogr., 1997, 3, 9 - 17). Ces auteurs ont montré que des dérivés iminodiacétiques de dextran portant des ions métalliques comme ligand d'affinité permettent une exclusion stérique et sont susceptibles de concentrer efficacement des solutions par leur propriétés d'adsorption et d'affinité. Ces auteurs ont montré qu'une colonne de gel AdSEC d'un volume de 5 ml pouvait fixer un pourcentage important de composés ayant un poids moléculaire compris entre 5 kDa et 50 kDa et les concentrer environ 1000 fois en une seule opération.

De tels supports permettent d'adsorber les plus petites molécules (ayant une affinité pour le ligand greffé) à des débits et des volumes importants (non autorisé en filtration sur gel). D'autre part lors de la synthèse du gel adsorbant, le seuil d'accessibilité au ligand d'affinité peut être modulé durant la synthèse du gel en fonction de la taille de la biomolécule à éliminer ou à purifier.

L'insuffisance rénale terminale touche actuellement 22000 personnes en France dont 20000 sont traitées par hémodialyse itérative. Seulement 1800 peuvent espérer être transplantées chaque année, sachant qu'un quart d'entre elles reviendra dans les cinq ans en hémodialyse en raison d'un rejet pour attendre une nouvelle transplantation.

La survie de l'urémique, toutes méthodes confondues peut dépasser 25 ans s'il n'est pas porteur d'affection cardio-vasculaire sévère. Dans ce cas, sa qualité de survie se trouve profondément altérée au fil des ans par les complications ostéoarticulaires de l'urémie terminale, au premier plan desquelles sont décrites les arthropathies érosives secondaires aux dépôts de la  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2-M).

Le mécanisme de survenue de ces arthropathies commence dès qu'apparaît l'insuffisance rénale responsable d'une accumulation de  $\beta$ 2-microglobuline. Cette protéine de poids moléculaire de 11800 Da, va s'accumuler dans l'organisme au fil des années et se déposer sélectivement au niveau des disques cervicaux, des épaules, des hanches et des poignets. Des dépôts cardiaques et digestifs ont été rapportés. Ces dépôts vont fragiliser l'articulation et l'os adjacent jusqu'à détruire totalement l'articulation. Ainsi, on observe un effondrement des corps vertébraux pouvant entraîner une compression médullaire avec perte de commande des quatre membres, des luxations articulaires irréversibles, une perte de la préhension au niveau des mains et des pseudo fractures de la hanche. Des compressions nerveuses canalaires sont observées comme le syndrome du canal carpien.

Ces complications conduisent irrémédiablement l'urémique vers l'invalidité et l'état grabataire que ne peuvent prévenir les méthodes de dialyse classique. La transplantation permet une stabilisation de ces lésions.

Afin de prévenir efficacement ces complications, il importe de pouvoir épurer efficacement les composants polluants du sang, en particulier la  $\beta$ 2-microglobuline, qui sont synthétisés quotidiennement par l'organisme et qui ne sont pas ou pas suffisamment éliminés par les reins défectueux chez les patients dialysés.

L'épuration de ces différentes biomolécules ne peut se faire qu'au niveau des membranes artificielles lors de la dialyse qui actuellement sont

insuffisamment efficaces malgré une épuration par filtration et adsorption non spécifique membranaire.

Les techniques existantes pour l'élimination des biomolécules dont la  $\beta 2$ -microglobuline sont actuellement de 3 types :

#### **1. Elimination des biomolécules par hémodialyse**

L'hémodialyse est une technique destinée à des sujets atteints d'une insuffisance rénale partielle ou totale (figure 1). Elle consiste en un traitement extracorporel du sang, assurant les mêmes fonctions que le rein grâce à un procédé membranaire. La partie essentielle de l'hémodialyseur (1) est une membrane d'échange, de part et d'autre de laquelle, circulent à contre courant le sang du patient et le dialysat issu du générateur d'hémodialyse (2). Cette technique permet l'épuration des composés de petit poids moléculaire polluant le sang, tels que l'urée, les acides aminés, les sels minéraux qui sont normalement éliminés par le rein. Dans le cas de la  $\beta 2$ -microglobuline sérique, les différentes membranes de dialyse couramment utilisées possèdent deux propriétés antagonistes :

- capture de la  $\beta 2$ -microglobuline par adsorption non-spécifique sur la membrane,
- génération de la  $\beta 2$ -microglobuline par décrochage de cette molécule qui est associée de façon non covalente à la surface des cellules nucléées sanguines dans le complexe majeur d'histocompatibilité de type I.

Le degré de génération de  $\beta 2$ -microglobuline est un des critères qui définissent la biocompatibilité des membranes. Ainsi fort de ces deux propriétés antagonistes, certaines membranes conduisent lors d'une séance d'hémodialyse globalement à une augmentation de la concentration en  $\beta 2$ -microglobuline, alors que d'autres la diminuent.

Cependant, quelles que soient les membranes utilisées, ces résultats sont nivelés sur des périodes supérieures à un an. Ainsi, il a été constaté que le taux plasmatique de la  $\beta 2$ -microglobuline chez les patients urémiques après quinze mois de dialyse était invariablement augmenté pour être compris entre 40 et 50 mg/l (contre 1 à 2 mg/l chez les patients sains). De tels problèmes de biocompatibilité se retrouvent également pour les autres biomolécules.

#### **2. Elimination des biomolécules par hémofiltration**

Une fois par mois, le dialysé subit une séance d'ultrafiltration. Le module utilisé (1) possède un seuil de coupure plus élevé qu'en hémodialyse (seuil moyen de 40 kDa) et permet l'élimination par filtration des petites molécules du plasma, dont les plus petites protéines, telle que la  $\beta 2$ -microglobuline (figure 2).

Durant une séance d'ultrafiltration, la perte d'eau plasmatique est compensée par un apport équivalent en liquide physiologique (3).

Les résultats qualitatifs, vis à vis de l'élimination de la  $\beta$ 2-microglobuline (épuration et génération de cette molécule par les membranes d'ultrafiltration), sont similaires à ceux obtenus en hémodialyse. On retrouve ainsi une influence importante de la nature de la membrane et de la durée de l'hémofiltration. Si certaines membranes semblent éliminer plus de  $\beta$ 2-microglobuline sur 5 heures (une séance), on assiste également à un nivellement des résultats au cours du temps. Au niveau quantitatif, il semble qu'environ 50% de la  $\beta$ 2-microglobuline sérique soit éliminée par séance d'hémofiltration. Cependant, même si cette technique est plus efficace pour l'épuration de la  $\beta$ 2-microglobuline que l'hémodialyse, elle reste insuffisante pour prévenir et empêcher l'apparition de la maladie. De plus, cette technique présente l'inconvénient d'éliminer de nombreuses autres petites protéines que la  $\beta$ 2-microglobuline, puisque l'ultrafiltrat est éliminé de façon définitive.

### 3. Couplage colonne/hémodialyseur

Cette méthode a été présentée comme une alternative aux méthodes usuelles d'hémodialyse et d'ultrafiltration (Nakazawa *et al.*, Int. J. Artif. Organs, 1994, 17, 203-208). Celle-ci consiste en une adsorption en série des biomolécules sur un gel poreux de cellulose (350 ml d'adsorbant), suivie d'une hémodialyse classique. Dans le cas de la  $\beta$ 2-microglobuline le gel est décrit pour avoir une capacité théorique pour la  $\beta$ 2-microglobuline de 1 mg par ml d'adsorbant. Les résultats obtenus sont les meilleurs décrits dans la littérature, puisque chez un patient dont le taux initial en  $\beta$ 2-microglobuline était de 30 mg/l, ce système a permis de réduire la concentration en  $\beta$ 2-microglobuline à 10 mg/l finale après 6 mois de traitement. Les auteurs ont présenté une amélioration du retardement de l'apparition des dépôts amyloïdes dans 2 cas sur 3, chez leurs patients après thérapie.

Cependant on observe également après traitement une chute de concentration de certaines molécules sériques (« rétinol binding protein », lysozymes). Ce phénomène est attribuable au passage directe du sang à travers l'adsorbant, qui est susceptible de générer des problèmes de biocompatibilité.

Ainsi les techniques existantes pour l'élimination de la  $\beta$ 2-microglobuline et des autres biomolécules ont principalement deux limites :

- la biocompatibilité des supports, notamment pour la génération de la  $\beta$ 2-microglobuline, c'est-à-dire l'équilibre entre l'adsorption non spécifique sur la membrane et la génération de la  $\beta$ 2-microglobuline lors du passage des cellules à leur



contact ; cet équilibre conditionne la quantité de  $\beta$ 2-microglobuline réellement éliminée lors d'une séance d'hémodialyse ou d'hémofiltration,

- la spécificité du substrat : en effet, les techniques d'hémofiltration et de liaison aspécifique avec des ligands couplés sur des gels conduisent à l'élimination non souhaitée d'autres molécules du sérum.

Un dispositif pour éliminer la  $\beta$ 2-microglobuline ou toute autre biomolécule devrait donc allier une élimination satisfaisante (quantitative) à une élimination spécifique (qualitative) de la molécule concernée.

Dans la présente invention, les inventeurs se sont donc donné pour objet :

- l'utilisation, dans un dispositif destiné à éliminer les biomolécules, d'un gel adsorbant alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel consistant essentiellement en une matrice de polysaccharide sur laquelle est greffé un polymère couplé à un ligand d'affinité (gel AdSEC, pour "*Adsorptive Size Exclusion Chromatography*") et ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa,

- l'utilisation d'un gel AdSEC pour séparer et purifier les biomolécules ayant un poids moléculaire compris entre 2 kDa et 60 kDa,

- un dispositif destiné à l'élimination de biomolécules d'un poids moléculaire compris entre 2 kDa et 60 kDa comprenant un module d'ultrafiltration éventuellement en amont et en série avec un module de dialyse et utilisant une colonne de gel AdSEC ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa, ladite colonne étant montée en dérivation dudit module d'ultrafiltration ; ce dispositif permet de s'affranchir des problèmes de biocompatibilité et d'éliminer spécifiquement les biomolécules désirées,

- un dispositif de purification de biomolécules d'un poids compris entre 2 kDa et 60 kDa utilisant une colonne de gel AdSEC ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa, ladite colonne étant éventuellement en dérivation d'un système de filtration ; ce dispositif permet de séparer les biomolécules normales et les biomolécules modifiées, par exemple par glycation.

Dans un mode avantageux de réalisation, la matrice de polysaccharide est de l'agarose ou à base d'un dérivé d'agarose, le polymère peut être le polyéthylèneglycol (PEG) ou le polypropylèneglycol (PPG) et le ligand d'affinité peut être par exemple un agent chélateur de métaux couplé à des ions métalliques, une protéine, un peptide, un substrat d'enzyme ou un inhibiteur d'enzyme.

Dans un mode préféré de réalisation, le gel adsorbant consiste en une matrice à base d'un dérivé d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique (IDA) lui-même couplé à des ions métalliques, par exemple des ions cuivreux ; ce complexe est appelé gel IMAdSEC (*"Immobilized Metal ion Adsorptive Size Exclusion Chromatography"*).

Dans un mode également préféré de réalisation, le seuil de coupure du gel adsorbant est de 20 kDa, permettant ainsi l'élimination ou la purification des biomolécules dont le poids moléculaire est inférieur à 20 kDa, en particulier la  $\beta$ 2-microglobuline sérique.

Le système d'épuration selon la présente invention possède la particularité de placer le gel adsorbant pour la biomolécule à éliminer en dérivation du système de circulation à épurer. Ainsi lorsqu'on épure du sang, il n'y a à aucun moment contact entre le gel et les éléments figurés du sang, donc les problèmes de biocompatibilité (par exemple, génération de  $\beta$ 2-microglobuline par contact des cellules nucléées du sang) ou d'hémolyse des cellules au contact du gel sont évités.

De plus, contrairement aux autres techniques utilisées actuellement, l'épuration de la biomolécule à éliminer ou à purifier est réalisée grâce à un ligand qui ne va retenir que cette molécule. Cette spécificité est obtenue grâce au double tamisage de la membrane d'ultrafiltration (qui retient par exemple les éléments figurés du sang et les grosses molécules sériques) et du gel AdSEC qui interdit l'accès au ligand à d'autres molécules affines pour le ligand d'affinité mais dont la taille est supérieure au seuil de coupure du gel.

L'autre intérêt de l'utilisation de ce gel AdSEC est sa facilité de régénération. Par exemple, lorsqu'on utilise un métal comme ligand d'affinité, celui-ci peut être chélaté par une solution d'EDTA, qui permet de décrocher toute molécule adsorbée sur le gel, autorisant ainsi un nettoyage du gel, sa régénération par une nouvelle charge du métal et sa stérilisation.

Le système d'élimination selon l'invention peut être utilisé par exemple dans le cadre d'une dialyse rénale ; dans ce cas il existe un avantage supplémentaire qui tient au fait que la fraction épurée par passage sur le gel AdSEC retourne au malade, limitant ainsi les pertes en autres éléments présents dans le sang.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples ainsi qu'aux figures annexées dans lesquelles :

- la figure 1 représente le schéma général de la dialyse rénale ; (1) hémodialyseur, (2) générateur d'hémodialyse, (3) pompe,

- la figure 2 représente le schéma d'une hémofiltration par ultrafiltration ; (1) hémofiltre, (2) générateur d'hémodialyse, (3) liquide physiologique, (4) pompe,
- la figure 3 illustre les chromatographies sur ions métalliques (cuivre) immobilisés sur 3 types de gels : A Sépharose<sup>®</sup> 4B-IDA-cuivre, pic 1 : protéines non adsorbées ;  
5 pic 2 : élution à pH 6,0 ; pic 3 : élution à pH 5,0 ; pic 4 : élution à pH 4,0 ; pic 5 : élution à pH 3,0 ; pic 6 : EDTA 25 mM. B Novarose<sup>®</sup>-IDA-cuivre, pic 1 : protéines non adsorbées ; pic 2 : élution à pH 6,0 ; pic 3 : élution à pH 5,0 ; pic 4 : élution à pH 4,0 ; pic 5 : élution à pH 3,0 ; pic 6 : EDTA 25 mM. C Novarose<sup>®</sup>-PEG/IDA-cuivre (IMAdSEC), pic 1 : protéines non adsorbées ; pic 2 : élution à pH 6,0 ;  
10 pic 3 : élution à pH 5,0 ; pic 4 : élution à pH 4,0 ; pic 5 : élution à pH 3,0 (1<sup>er</sup> pic) ; pic 5' élution à pH 3,0 (2<sup>ème</sup> pic) ; pic 6 : EDTA 25 mM,
- la figure 4 illustre l'analyse électrophorétique des fractions séparées par chromatographie illustrée figure 3 ; les numéros correspondent aux fractions séparées par chromatographie de la figure 3 ; A Sépharose<sup>®</sup> 4B-IDA-cuivre.  
15 B Novarose<sup>®</sup>-IDA-cuivre. C Novarose<sup>®</sup>-PEG/IDA-cuivre (IMAdSEC). Cette figure illustre la spécificité du gel IMAdSEC pour la  $\beta$ 2-microglobuline par rapport aux deux autres types de gels,
- la figure 5 illustre l'analyse par spectrométrie de masse de la composition protéique de l'ultrafiltrat de départ et de la fraction retenue sur gel IMAdSEC. A (I)  
20 spectre de l'ultrafiltrat, (II) déconvolution du spectre (a) calcul de la masse de la  $\beta$ 2-microglobuline (b) calcul de la masse de l'albumine. B (I) spectre de la fraction purifiée, (II) déconvolution du spectre et calcul de la masse de la  $\beta$ 2-microglobuline,
- la figure 6 illustre la capacité du gel IMAdSEC pour la  $\beta$ 2-microglobuline,  
25 - la figure 7 illustre le montage en dérivation d'un module de filtration du dispositif de purification selon l'invention ; (1) module d'ultrafiltration, (2) colonne contenant le gel IMAdSEC, (3) pompes, (4) ultrafiltrat,
- la figure 8 illustre la capacité du dispositif illustré figure 7 pour l'élimination de la  $\beta$ 2-microglobuline d'un l'ultrafiltrat d'un patient urémique,
- la figure 9 illustre l'analyse électrophorétique des fractions séparées par chromatographie illustrée figure 8 ; 1 : ultrafiltrat ; 2 : 15 minutes de passage sur le gel IMAdSEC ; 3 : 30 minutes de passage sur le gel IMAdSEC ; 4 : 120 minutes de passage sur le gel IMAdSEC ; 5 : fraction éluee à pH 5,0 ; 6 : fraction éluee à pH 4,0 ; 7 fraction éluee à pH 3,0 ; 8 : fraction éluee avec EDTA, 9 : standard  
30 protéique,  
35

- la figure 10 représente un système d'hémodialyse comprenant le dispositif selon l'invention ; (1) hémofiltre, (2) hémodialyseur, (3) colonne IMAdSEC, (4) générateur d'hémodialyse, (5) pompe sanguine et (6) pompe d'ultrafiltration.

## 5 **EXEMPLE 1**

**Détermination de la spécificité et de la capacité d'un gel IMAdSEC : (Novarose®-PEG/IDA-cuivre) pour la  $\beta$ 2-microglobuline**

### **1. Synthèse du gel Novarose®-PEG/IDA-cuivre :**

**Etape 1 :** couplage du PEG et création du seuil de coupure du gel :

10 On reprend 10 g de Novarose® Act High 100/40 (INOVATA, Bromma, Suède), préalablement séchés par succion, dans 5 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M,  $\text{pH} > 12$  et 5 ml d'eau désionisée. On ajoute 5 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M,  $\text{pH} > 12$ , 5 ml d'eau désionisée et 30 ml de  $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$  à 10% dans du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M,  $\text{pH} > 12$ . On laisse le mélange sous agitation douce à température ambiante ( $22^\circ\text{C}$ ) pendant 1 à 24 heures suivant le seuil de coupure souhaité (ce temps est de 4 heures pour un seuil de coupure de 20 kDa qui est le seuil souhaité pour la  $\beta$ 2-microglobuline).

**Etape 2 :** couplage du ligand : l'acide iminodiacétique (IDA).

20 On rince le gel obtenu à l'étape 1 sur fritté (par succion) par une solution d'eau désionisée. On le resuspend dans une solution comprenant 15 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M,  $\text{pH} > 12$ , 15 ml d'eau désionisée, et 10 ml d'une solution d'IDA à 10% dans  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M,  $\text{pH} > 12$ . On laisse le mélange sous agitation douce à température ambiante ( $22^\circ\text{C}$ ) pendant 48 heures. On rince le gel IMAdSEC sur fritté successivement par de l'eau désionisée, par une solution de soude 1M, par de l'eau désionisée, par une solution d'acide chlorhydrique 0,1M, puis par de l'eau désionisée.

25 On conserve le gel ainsi obtenu à  $4^\circ\text{C}$  dans une solution d'éthanol à 20% jusqu'à son utilisation.

**Etape 3 :** couplage des ions métalliques (ions cuivres  $\text{Cu II}$ ) :

La charge de métal est réalisée en utilisant une solution aqueuse de sulfate de cuivre à 50 mM dans des conditions classiques.

### 30 **2. Préparation des solutions biologiques**

Les produits sont issus de l'hémofiltration du sang lors de séance d'ultrafiltration dans le cadre du traitement de patients urémiques (figure 2). On utilise des ultrafiltrats ( $\text{pH } 7,2$ ,  $13 \text{ mS/cm}$ ) dont la concentration en  $\beta$ 2-microglobuline varie de 7 à 20 mg/l selon les patients.

3. Spécificité du gel Novarose<sup>®</sup>-PEG/IDA-cuivre pour la  $\beta$ 2-microglobuline par rapport à des gels sans tamisage Sépharose<sup>®</sup> 4B-IDA-cuivre et Novarose<sup>®</sup>-IDA-cuivre.

MODE OPERATOIRE :

5 On a testé 3 gels : Sépharose<sup>®</sup> 4B-IDA-cuivre, Novarose<sup>®</sup>-IDA-cuivre (gels IMAC) et Novarose<sup>®</sup>-PEG /IDA-cuivre (gel IMAAdSEC), pour leur capacité à adsorber les molécules de l'ultrafiltrat d'un patient urémique. Le gel de Sépharose<sup>®</sup> 4B-IDA a été préparé selon le protocole décrit par Sundberg et Porath (J. Chromatogr., 1974, 20, 87-98). Le gel Novarose<sup>®</sup>-IDA résulte du même protocole que celui décrit  
10 ci-dessus au point 1 pour la synthèse du gel IMAAdSEC, où seule la deuxième et la troisième étape ont été réalisées (pas d'activation préalable du gel par le PEG). On applique 2 ml de gel dans une colonne (diamètre 1 cm) et on réalise une chromatographie basse pression (1 ml/min). On fait passer 10 ml d'ultrafiltrat d'un patient, dont la concentration en  $\beta$ 2-microglobuline est de 20  $\mu$ g/ml sur chacun des 3  
15 différents gels en circuit fermé durant 20 minutes. On réalise l'équilibration et le rinçage de chaque colonne après adsorption de l'ultrafiltrat par un tampon MMA pH 7,0 (MMA = MOPS, MES, Acétate, 25 mM chacun). On élue par un gradient décroissant discontinu de pH (Tampon, MMA 25 mM, pH 6,0, puis pH 5,0, puis pH 4,0 et glycine 25 mM à pH 3,0), puis par une solution d'EDTA (50 mM) pour  
20 décrocher le cuivre. On mesure la teneur en protéines lors de la chromatographie par lecture de la densité optique ( $\lambda = 280$  nm) avec un détecteur placé en sortie de colonne. On réalise le dosage de la  $\beta$ 2-microglobuline par un dosage immunologique (Anticorps polyclonal de lapin anti  $\beta$ 2-microglobuline humaine, Dako, Danemark) utilisant un appareil de néphélométrie (Beckman, USA). On analyse les différentes  
25 fractions par électrophorèse SDS-PAGE, selon le protocole décrit par Laemmli (Nature, 1970, 227, 680-685) et coloration des protéines au nitrate d'argent. Après dessalage et concentration, on analyse les fractions par spectrométrie de masse (technique ESI-MS pour "*ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry*"), dont la sensibilité, déterminant la masse au Dalton près, permet d'identifier les molécules.

30 RESULTATS :

\* La chromatographie sur gel de Sépharose<sup>®</sup> 4B-IDA-cuivre (figure 3A) montre que, si la  $\beta$ 2-microglobuline présente une affinité importante pour le cuivre chélaté, son élution a lieu dans les mêmes fractions que l'albumine (figure 4A). Toutes les protéines de l'ultrafiltrat sont adsorbées sur le gel, qui ne présente donc pas  
35 de spécificité pour la  $\beta$ 2-microglobuline.

\* La chromatographie sur gel Novarose®-IDA-cuivre (figure 3B) montre également que ce type de gel permet l'adsorption de toutes les protéines de l'ultrafiltrat (figure 4B). Sa capacité en cuivre plus faible que celle du Sépharose®-4B-IDA résulte en revanche en des éluions de protéines lors du gradient discontinu de pH, contrairement au gel Sépharose® 4B-IDA (figure 4B versus 4A). Comme ce dernier, il n'assure pas de spécificité pour la  $\beta$ 2-microglobuline (figure 4B).

\* La chromatographie sur gel Novarose®-PEG/IDA-cuivre en revanche a permis l'adsorption de la seule  $\beta$ 2-microglobuline de l'ultrafiltrat du patient. Son élution a lieu à pH 3,0 en deux pics distincts (figure 4C).

Dans les trois types de chromatographie, les analyses par néphélémétrie confirment la disparition totale de la  $\beta$ 2-microglobuline de la fraction d'ultrafiltrat passée sur les 3 types de gels et son élution de la colonne.

L'analyse ESI-MS montre que la chromatographie sur gel IMAdSEC permet de passer d'une fraction constituée d'un mélange de départ : albumine +  $\beta$ 2-microglobuline, à une fraction éluee à pH 3,0 qui contient uniquement la  $\beta$ 2-microglobuline (figure 5A versus 5B).

Ces résultats montrent l'affinité de la  $\beta$ 2-microglobuline pour le ligand (métal chélaté, ici le cuivre) et la spécificité apportée par le tamisage moléculaire (couplage du PEG) du gel IMAdSEC par rapport aux gels IMAC classiques.

#### **4. Capacité du gel IMAdSEC-cuivre pour la $\beta$ 2-microglobuline.**

##### **MODE OPERATOIRE :**

50 ml d'ultrafiltrat d'un patient urémique, contenant 350  $\mu$ g de  $\beta$ 2-microglobuline (soit une concentration de  $\beta$ 2-microglobuline de 7  $\mu$ g/ml) circule en circuit fermé pendant 150 minutes sur 0,65 ml de gel IMAdSEC dans les mêmes conditions chromatographiques que précédemment (débit = 1 ml/min). On élue directement à pH 4,0 (figure 6).

##### **RESULTATS :**

Après 150 minutes, la concentration en  $\beta$ 2-microglobuline mesurée par néphélémétrie est de 2,3  $\mu$ g/ml, soit une quantité en  $\beta$ 2-microglobuline restante de 115  $\mu$ g. Par conséquent, 235  $\mu$ g de  $\beta$ 2-microglobuline ont été fixés sur les 0,65 ml de gel, ce qui correspond à une capacité de fixation du gel IMAdSEC-cuivre de 360  $\mu$ g/ml. L'analyse SDS-PAGE et ESI-MS des fractions a été réalisée comme décrit précédemment. La quantité de  $\beta$ 2-microglobuline, éluee à pH 4,0, est d'environ 180  $\mu$ g au lieu de 235  $\mu$ g attendus. La différence peut être expliquée par l'absence de mesure des fractions de rinçage et d'EDTA susceptibles de contenir elles aussi de la  $\beta$ 2-microglobuline.

Ces résultats suggèrent que, compte-tenu de ces performances et de cette spécificité pour la  $\beta$ 2-microglobuline, une colonne de 500 à 750 ml de gel IMAdSEC-cuivre permettrait d'éliminer 250 mg de  $\beta$ 2-microglobuline, quantité qui correspond à 5 litres de sang à une concentration en  $\beta$ 2-microglobuline de 50 mg/l.

## EXEMPLE 2

**Séparation et purification de la  $\beta$ 2-microglobuline par un dispositif comprenant le couplage d'un module d'ultrafiltration et d'une colonne IMAdSEC**

### MODE OPERATOIRE

On utilise le montage représenté figure 7. Le module d'ultrafiltration (1) utilisé est composé de 100 fibres creuses en Polysulfone tirées d'un module d'ultrafiltration commercial modèle Fresenius F80.

On passe 50 ml d'ultrafiltrat d'un patient urémique (concentration en  $\beta$ 2-microglobuline = 7  $\mu$ g/ml) en circuit fermé durant 3 heures sur l'ensemble mini-module d'ultrafiltration/colonne de gel IMAdSEC (0,65 ml de gel IMAdSEC). Les conditions de chromatographie sont celles de l'exemple 1 à savoir : tampon, MMA 25 mM, pH 6,0, puis pH 5,0, puis pH 4,0 et glycine 25 mM à pH 3,0, puis EDTA 50 mM pour éluier le cuivre chélaté sur le gel.

Après 3 heures, on mesure la concentration en  $\beta$ 2-microglobuline dans le réservoir par néphélémétrie.

### RESULTATS

On passe d'une concentration de 7  $\mu$ g/ml en  $\beta$ 2-microglobuline (soit une quantité de départ de 350  $\mu$ g) à environ 1  $\mu$ g/ml (50  $\mu$ g de  $\beta$ 2-microglobuline restante). Par conséquent environ 300  $\mu$ g de  $\beta$ 2-microglobuline ont été fixés sur les 0,65 ml de gel IMAdSEC, ce qui correspond à une capacité de fixation du gel IMAdSEC pour la  $\beta$ 2-microglobuline de 461  $\mu$ g/ml.

L'analyse ESI-MS (figure 8) et SDS-PAGE (figure 9) des fractions montrent que la  $\beta$ 2-microglobuline a été adsorbée de façon spécifique par le gel IMAdSEC. Elle est éluée en deux fractions principales à pH 4,0 et pH 5,0.

Ces résultats suggèrent que le gel IMAdSEC pourrait être utile pour la séparation des biomolécules et de leurs isoformes comme par exemple la  $\beta$ 2-microglobuline normale et la  $\beta$ 2-microglobuline glycatée.

### **REVENDICATIONS**

1. Utilisation, dans un dispositif destiné à éliminer les biomolécules, d'un gel adsorbant alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel adsorbant consistant essentiellement en une matrice de polysaccharide sur laquelle est greffé un polymère couplé à un ligand d'affinité et  
5 ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa.
2. Utilisation d'un gel adsorbant alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel adsorbant consistant essentiellement en une matrice de polysaccharide sur laquelle est greffé un polymère  
10 couplé à un ligand d'affinité et ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa, pour séparer et purifier les biomolécules.
3. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 et 2 caractérisée en ce que la matrice de polysaccharide est de l'agarose ou à base d'un dérivé d'agarose, le polymère est choisi dans le groupe comprenant le  
15 polyéthylèneglycol et le polypropylèneglycol et le ligand d'affinité est choisi dans le groupe comprenant les agents chélateurs de métaux couplés à des ions métalliques, les protéines, les peptides, les substrats d'enzymes ou les inhibiteurs d'enzymes.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que le gel adsorbant consiste en une matrice à base d'un dérivé  
20 d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux.
5. Utilisation, dans un dispositif destiné à éliminer les biomolécules, d'un gel adsorbant alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel adsorbant consistant en une matrice à base d'un dérivé d'agarose  
25 sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux et ayant un seuil de coupure de 20 kDa.
6. Utilisation d'un gel adsorbant alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel adsorbant consistant en une matrice à base d'un dérivé d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol  
30 couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux et ayant un seuil de coupure de 20 kDa, pour séparer et purifier les biomolécules.
7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 5 et 6 caractérisée en ce que la biomolécule est la  $\beta$ 2-microglobuline sérique.
8. Dispositif pour éliminer les biomolécules comprenant un module  
35 d'ultrafiltration éventuellement en amont et en série d'un module de dialyse, caractérisé en ce que ce dispositif comprend en plus une colonne contenant un gel



adsorbant alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel adsorbant consistant essentiellement en une matrice de polysaccharide sur laquelle est greffé un polymère couplé à un ligand d'affinité et ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa, la dite colonne étant montée en  
5 dérivation dudit module d'ultrafiltration.

9. Dispositif selon la revendication 8 caractérisé en ce que le gel adsorbant consiste en une matrice à base d'un dérivé d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux et ayant un seuil de coupure de 20 kDa.

10. Dispositif pour séparer et purifier des biomolécules comprenant une  
10 colonne contenant un gel adsorbant alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel consistant essentiellement en une matrice de polysaccharide sur laquelle est greffé un polymère couplé à un ligand d'affinité et ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa, ladite colonne  
15 étant éventuellement montée en dérivation d'un module de filtration.

11. Dispositif selon la revendication 10 caractérisé en ce que le gel adsorbant consiste en une matrice à base d'un dérivé d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux et ayant un seuil de coupure de 20 kDa.

20 12. Dispositif selon la revendication 9 ou la revendication 11 caractérisé en ce que la biomolécule est la  $\beta$ 2-microglobuline sérique.

13. Utilisation du dispositif selon les revendications 8 à 12 pour éliminer les biomolécules du sang, à l'exception de la dialyse extra-corporelle.

25 14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que le dispositif comprend un gel adsorbant consistant en une matrice à base d'un dérivé d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux et ayant un seuil de coupure de 20 kDa.

30 15. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que la biomolécule est la  $\beta$ 2-microglobuline sérique.

16. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 8 à 12 caractérisé en ce que le dispositif est un système de dialyse extra-corporelle.

**REVENDEICATIONS MODIFIEES**

[reçues par le Bureau International le 10 avril 2000 (10.04.00);  
revendications originales 1-16 remplacées par de nouvelles  
revendications 1-9 (2 pages)]

1. Dispositif pour éliminer les biomolécules comprenant un module d'ultrafiltration éventuellement en amont et en série d'un module de dialyse, caractérisé en ce que ce dispositif comprend en plus une colonne contenant un gel adsorbant  
5 alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel adsorbant consistant essentiellement en une matrice de polysaccharide sur laquelle est greffé un polymère couplé à un ligand d'affinité et ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa, la dite colonne étant montée en dérivation dudit module d'ultrafiltration.
- 10 2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gel adsorbant consiste en une matrice à base d'un dérivé d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux et ayant un seuil de coupure de 20 kDa.
3. Dispositif pour séparer et purifier des biomolécules comprenant  
15 une colonne contenant un gel adsorbant alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel consistant essentiellement en une matrice de polysaccharide sur laquelle est greffé un polymère couplé à un ligand d'affinité et ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa, ladite colonne étant éventuellement montée en dérivation d'un module de filtration.
- 20 4. Dispositif selon la revendication 3, caractérisé en ce que le gel adsorbant consiste en une matrice à base d'un dérivé d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux et ayant un seuil de coupure de 20 kDa.
5. Dispositif selon la revendication 2 ou la revendication 4, caractérisé en ce que la biomolécule est la  $\beta$ 2-microglobuline sérique.  
25
6. Utilisation du dispositif selon les revendications 1 à 5 pour éliminer les biomolécules du sang, à l'exception de la dialyse extra-corporelle.
7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le dispositif comprend un gel adsorbant consistant en une matrice à base d'un dérivé  
30 d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux et ayant un seuil de coupure de 20 kDa.

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que la biomolécule est la  $\beta$ 2-microglobuline sérique.

9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le dispositif est un système de dialyse extra-corporelle.

5

THIS PAGE BLANK (USP 10)

09/830677

JC08 Rec'd PCT/PTO 30 APR 2009

THE FOLLOWING IS THE ENGLISH TRANSLATION OF THE  
AMENDMENTS TO THE CLAIMS OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION UNDER PCT ARTICLE 19: AMENDED SHEETS  
(Pages 16 and 17).

**PAGE BLANK (USPTO)**

CLAIMS

1. Use, in a device intended to remove biomolecules, of an adsorbent gel combining the  
5 properties of size exclusion and affinity chromatographies, said adsorbent gel consisting essentially of a polysaccharide matrix onto which is grafted a polymer coupled to an affinity ligand and having an adjustable cut-off of between 2 kDa and 60  
10 kDa.
2. Use of an adsorbent gel combining the properties of size exclusion and affinity chromatographies, said adsorbent gel consisting essentially of a polysaccharide matrix onto which is  
15 grafted a polymer coupled to an affinity ligand and having an adjustable cut-off of between 2 kDa and 60 kDa, for separating and purifying biomolecules.
3. Use according to either of claims 1 and 2, characterized in that the polysaccharide matrix is  
20 agarose or is based on an agarose derivative, the polymer is chosen from the group comprising polyethylene glycol and polypropylene glycol and the affinity ligand is chosen from the group comprising metal chelating agents coupled to metal ions, proteins,  
25 peptides, enzyme substrates or enzyme inhibitors.
4. Use according to any one of claims 1 to 3, characterized in that the adsorbent gel consists of a matrix based on an agarose derivative onto which is grafted polyethylene glycol coupled to iminodiacetic  
30 acid itself coupled to copper(I) ions.
5. Use, in a device intended for removing biomolecules, of an adsorbent gel combining the properties of size exclusion and affinity chromatographies, said adsorbent gel consisting of a  
35 matrix based on an agarose derivative onto which is grafted polyethylene glycol coupled to iminodiacetic acid itself coupled to copper(I) ions and having a cut-off of 20 kDa.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



6. Use of an adsorbent gel combining the properties of size exclusion and affinity chromatographies, said adsorbent gel consisting of a matrix based on an agarose derivative onto which is grafted polyethylene glycol coupled to iminodiacetic acid itself coupled to copper(I) ions and having a cut-off of 20 kDa, for separating and purifying biomolecules.

7. Use according to either of claims 5 and 6, characterized in that the biomolecule is serum  $\beta$ 2-microglobulin.

8. Device for removing biomolecules comprising an ultrafiltration module optionally upstream and in series with a dialysis module, characterized in that this device further comprises a column containing an adsorbent gel combining the properties of size exclusion and affinity chromatographies, said adsorbent gel consisting essentially of a polysaccharide matrix onto which is grafted a polymer coupled to an affinity ligand and having an adjustable cut-off of between 2 kDa and 60 kDa, said column being mounted branching from said ultrafiltration module.

9. Device according to claim 8, characterized in that the adsorbent gel consists of a matrix based on an agarose derivative onto which is grafted polyethylene glycol coupled to iminodiacetic acid itself coupled to copper(I) ions and having a cut-off of 20 kDa.

10. Device for separating and purifying biomolecules comprising a column containing an adsorbent gel combining the properties of size exclusion and affinity chromatographies, said gel consisting essentially of a polysaccharide matrix onto which is grafted a polymer coupled to an affinity ligand and having an adjustable cut-off of between 2 kDa and 60 kDa, said column being optionally mounted branching from a filtration module.

11. Device according to claim 10, characterized in that the adsorbent gel consists of a matrix based on an agarose derivative onto which is grafted polyethylene



... PAGE BLANK (USF10)

glycol coupled to iminodiacetic acid itself coupled to copper(I) ions and having a cut-off of 20 kDa.

12. Device according to claim 9 or claim 11, characterized in that the biomolecule is serum  $\beta$ 2-microglobulin.

13. Use of the device according to claims 8 to 12 for removing biomolecules from blood, with the exception of extracorporeal dialysis.

14. Use according to claim 13, characterized in that the device comprises an adsorbent gel consisting of a matrix based on an agarose derivative onto which is grafted polyethylene glycol coupled to iminodiacetic acid itself coupled to copper(I) ions and having a cut-off of 20 kDa.

15. Use according to claim 14, characterized in that the biomolecule is serum  $\beta$ 2-microglobulin.

16. Device according to any one of claims 8 to 12, characterized in that the device is an extracorporeal dialysis system.



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1/8

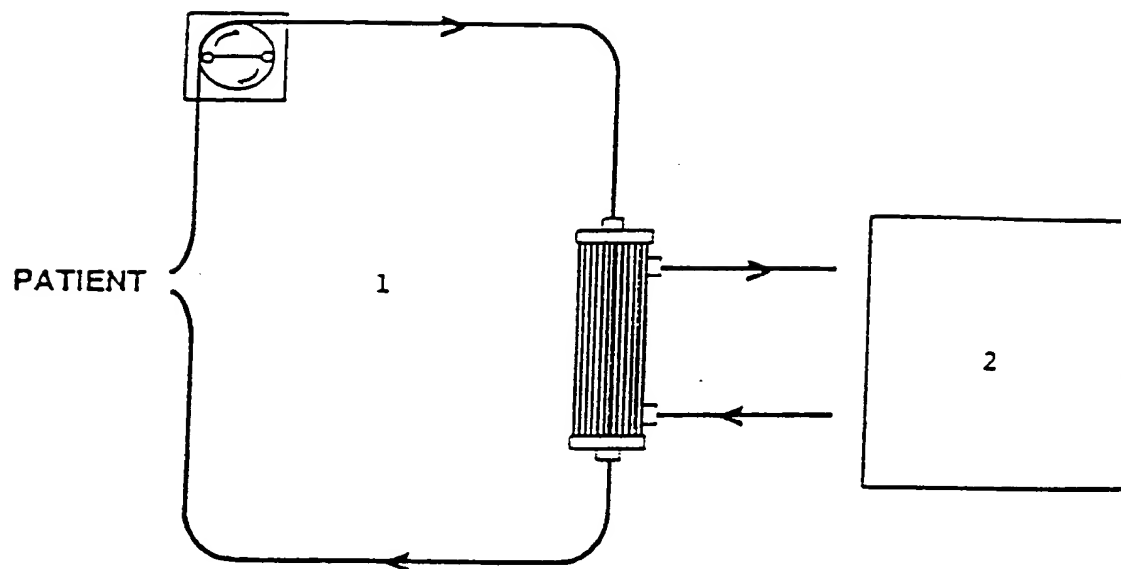


Figure 1

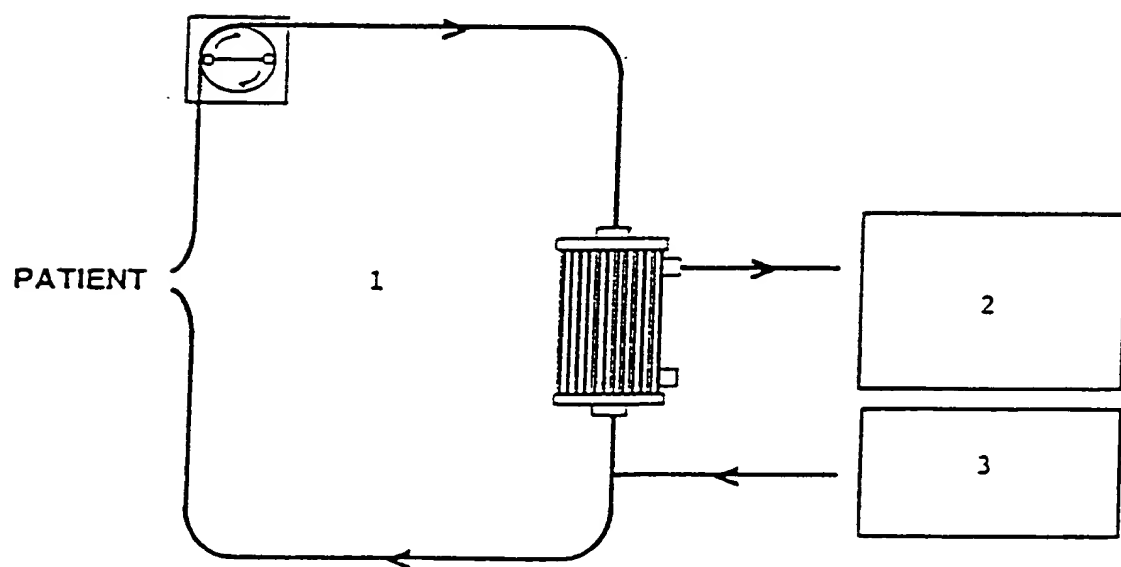
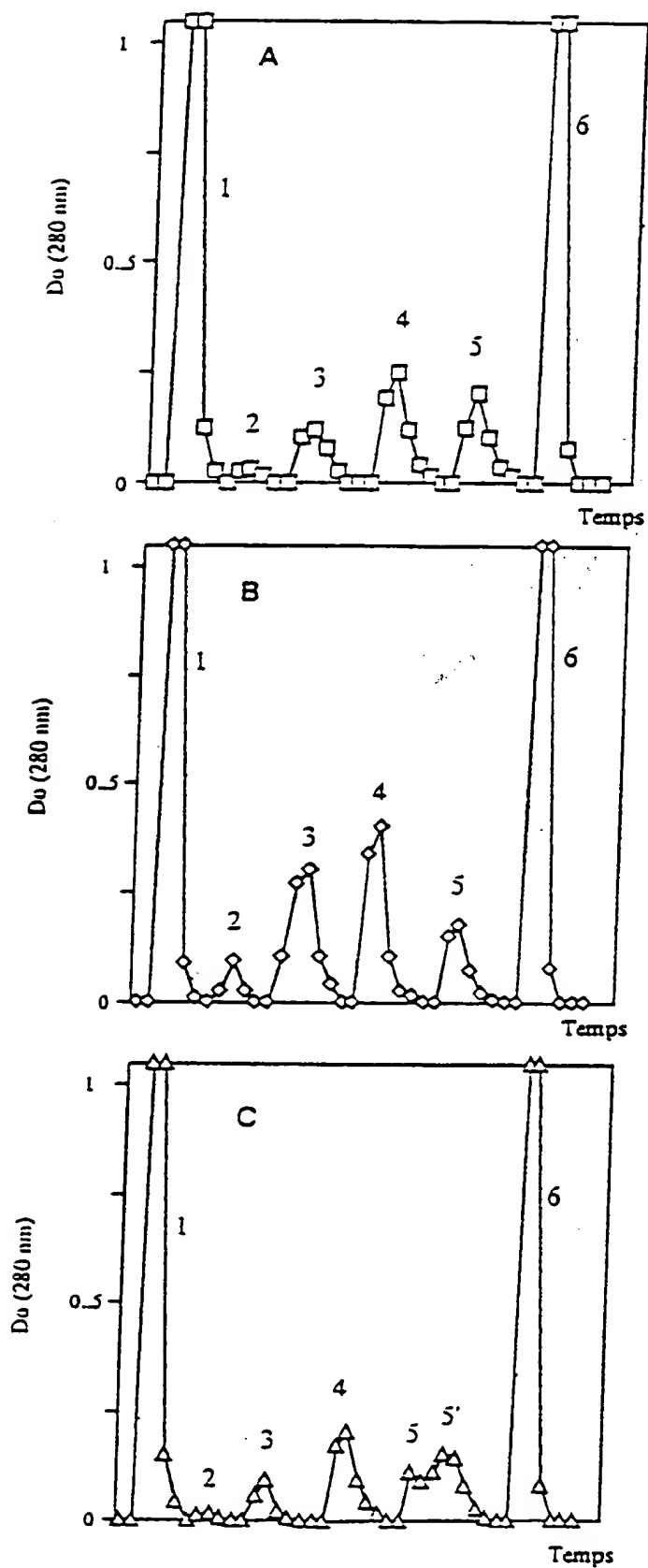


Figure 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

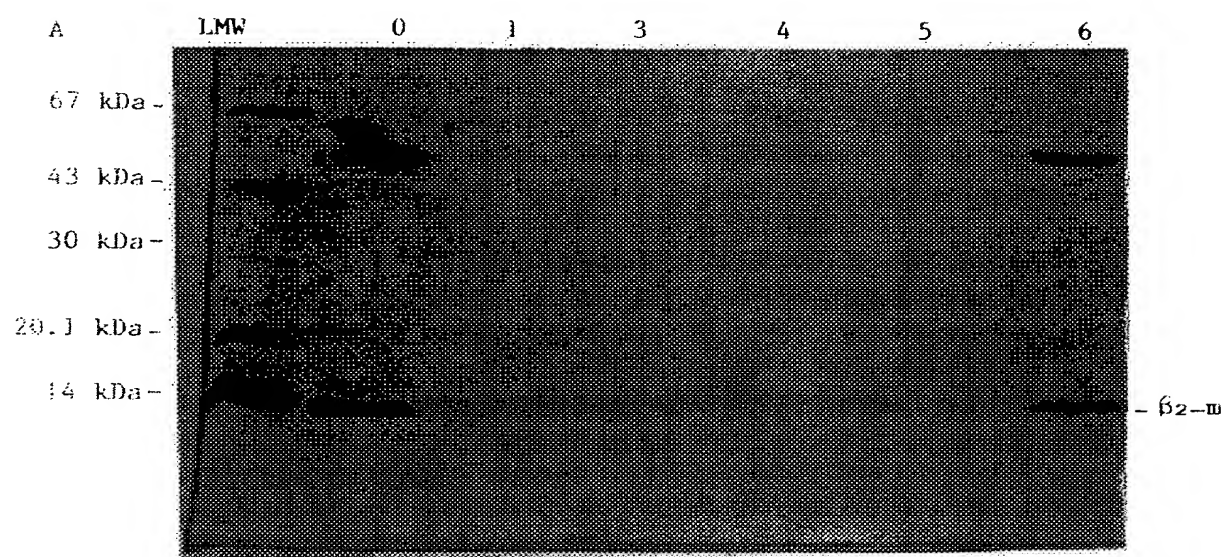
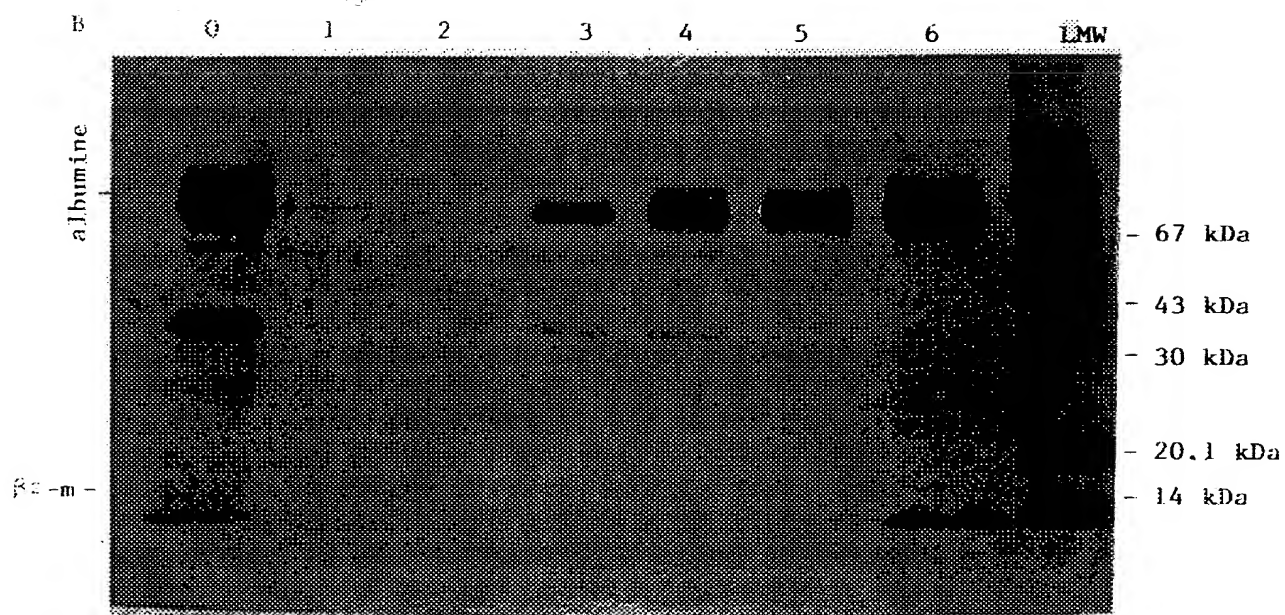
2/8

Figure 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

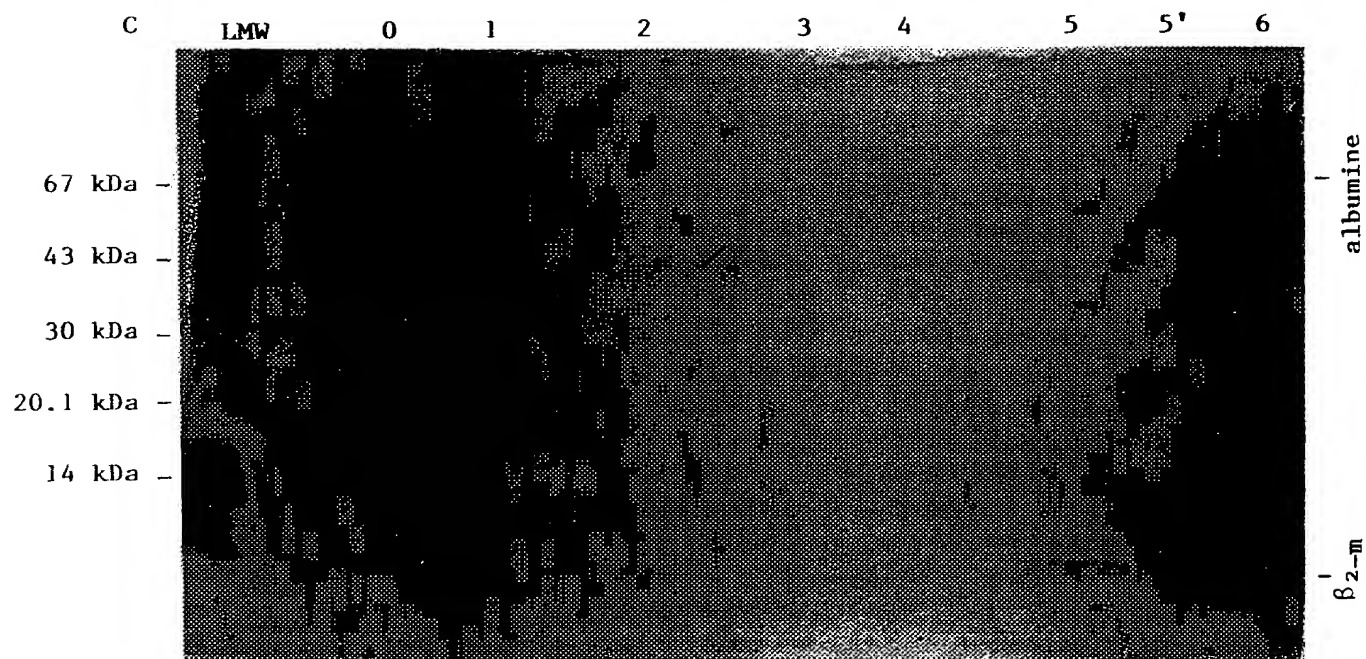


3/8

Figure 4aFigure 4b

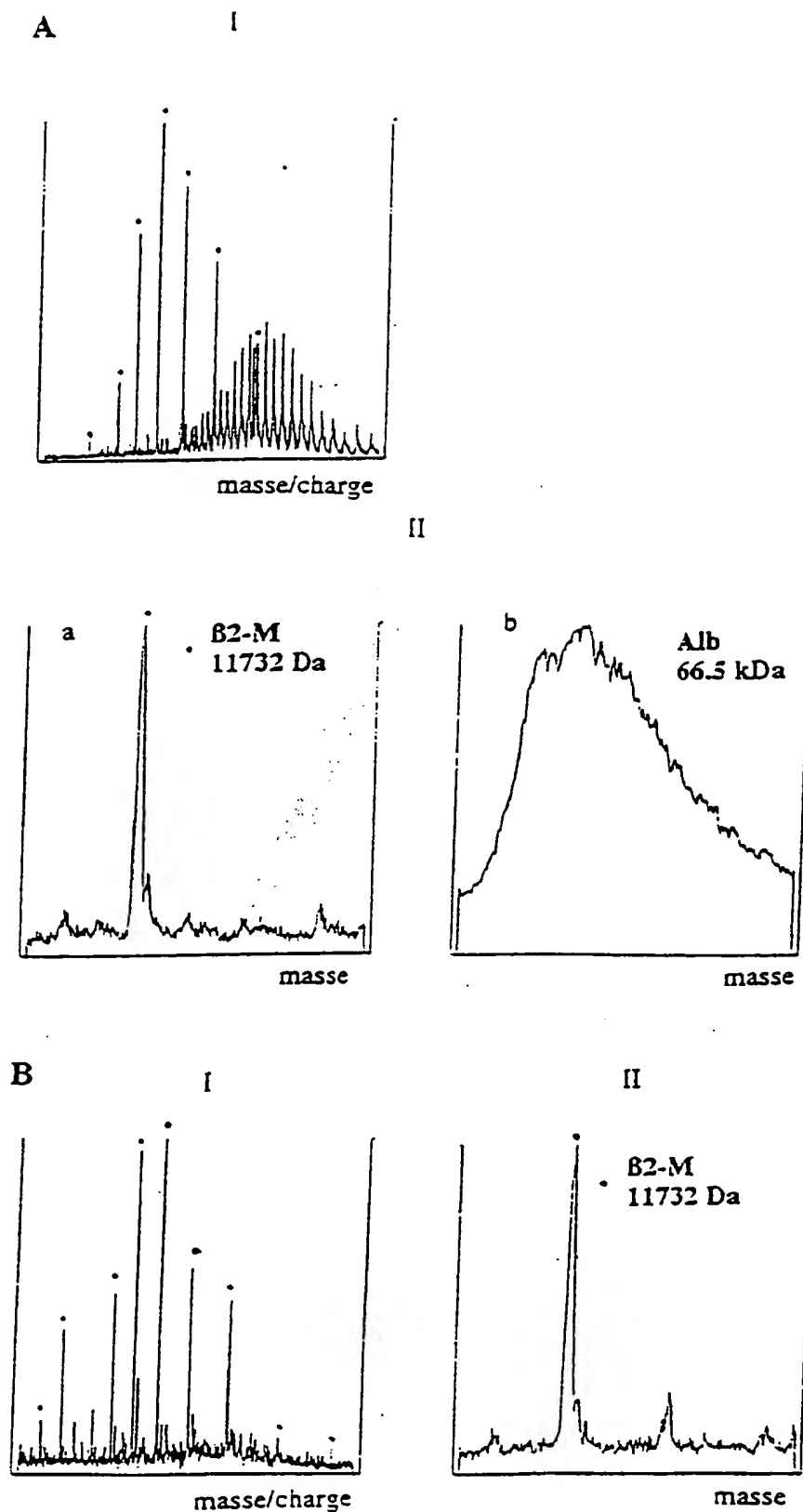
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/8

Figure 4c

**THIS PAGE BLANK**

5/8

Figure 5

THIS PAGE BLANK (USP10)

6 / 8

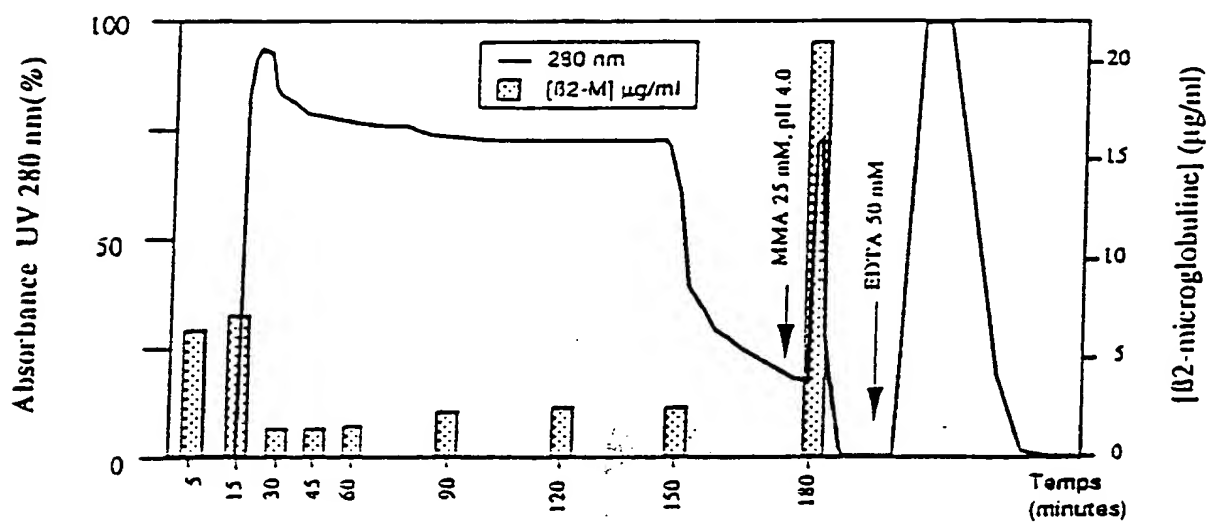


Figure 6

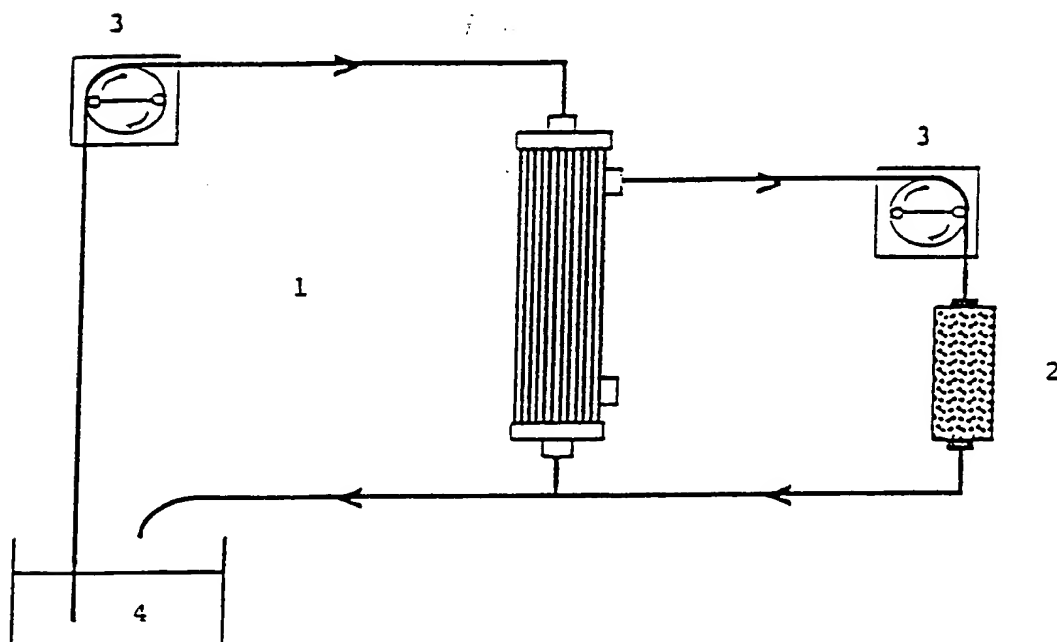
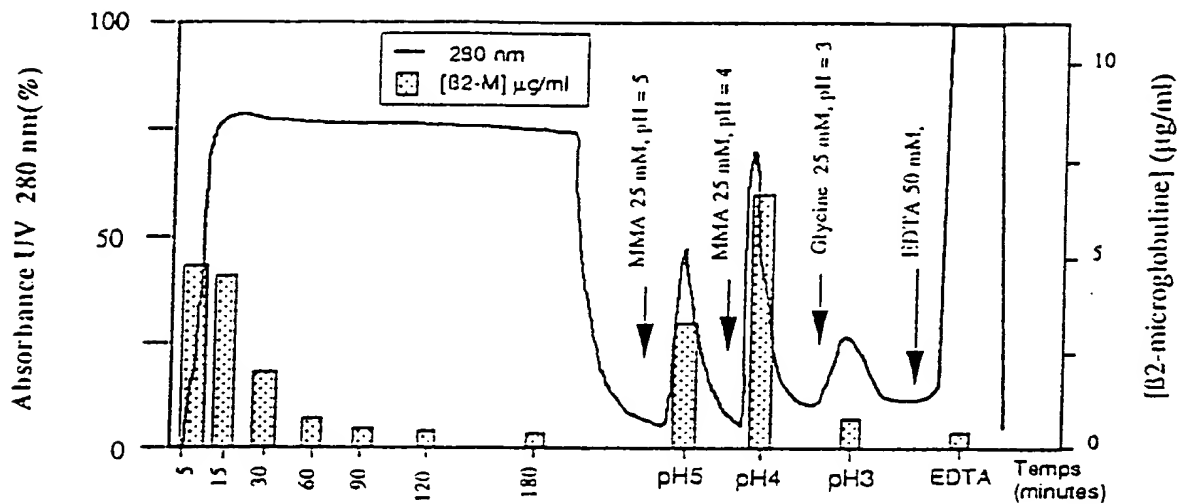
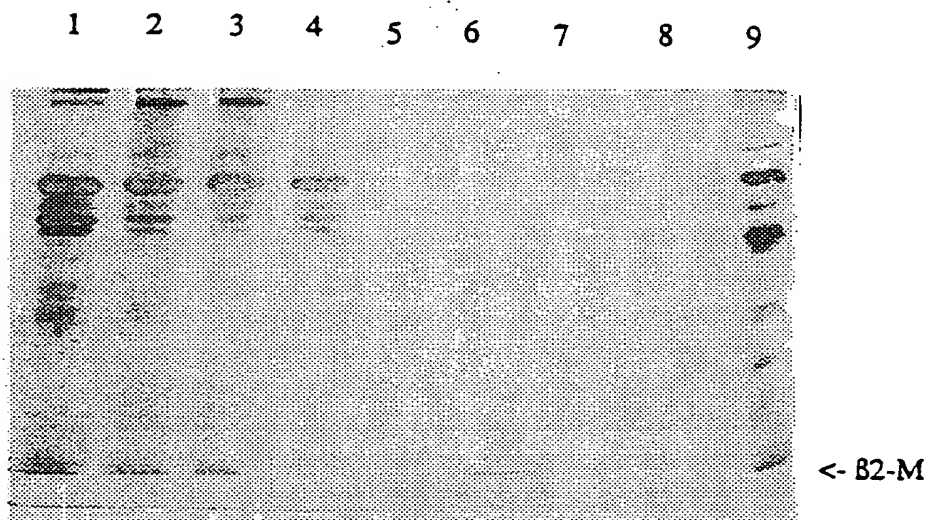


Figure 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)



7/8

**Figure 8****Figure 9**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

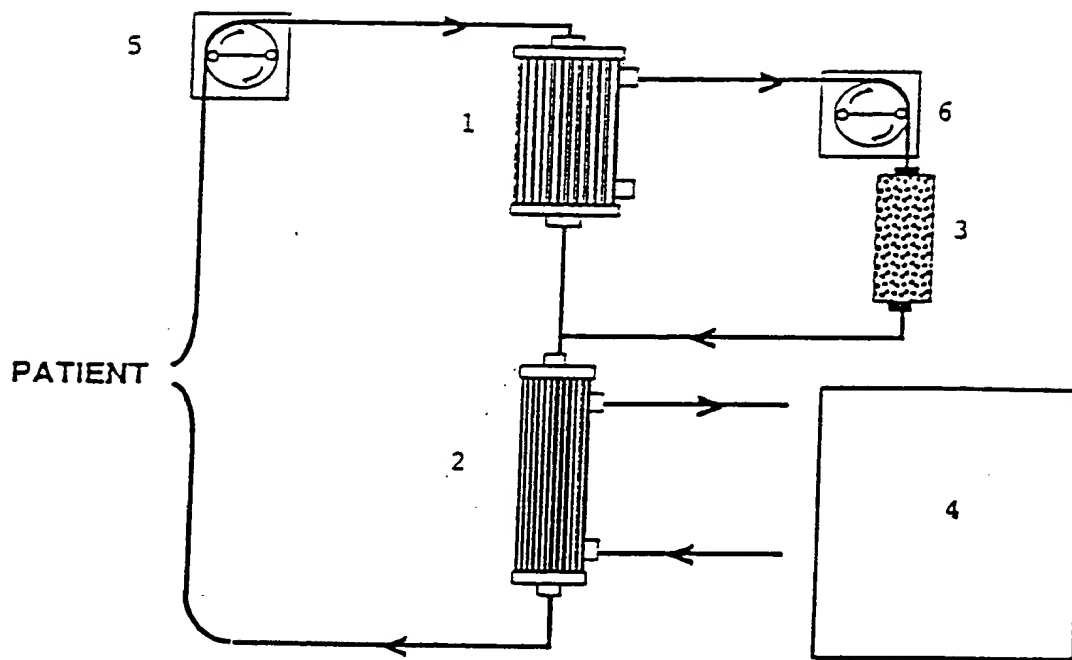


Figure 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. onal Application No

PCT/FR 99/02635

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01J20/32 B01D15/08 A61M1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J B01D A61M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| Y        | J. PORATH: "adsorptive size exclusion chromatography (concentration) Adsec"<br>INT. J. OF BIOCHROMATOGRAPHY,<br>vol. 3, no. 1, 1997, pages 9-17,<br>XP002110958<br>cited in the application<br>page 13 -page 15      | 1-4, 10,<br>13        |
| Y        | EP 0 295 073 A (CHROMATOCHEM),<br>14 December 1988 (1988-12-14)<br>page 2, line 59 -page 3, line 3<br>page 3, line 58 - line 65<br>page 4, line 59 - line 65<br>page 7, line 43 - line 46<br>page 7, line 65<br>-/-- | 1-4, 10,<br>13        |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 January 2000

Date of mailing of the international search report

09/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hilgenga, K

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No

PCT/FR 99/02635

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| A        | US 4 770 774 A (N. IDA)<br>13 September 1988 (1988-09-13)<br>column 2, line 39<br>column 4, line 5 - line 24<br>----  | 1-16                  |
| A        | US 4 721 730 A (S. FURUYOSHI)<br>26 January 1988 (1988-01-26)<br>column 4, line 27 - line 28<br>column 5, line 50 - line 57<br>column 8; example 8<br>----  | 1-16                  |
| A        | EP 0 510 393 A (W.R. GRACE & CO.)<br>28 October 1992 (1992-10-28)<br>page 4, line 34 - line 38<br>page 13, line 29 - line 35<br>page 14, line 30 - line 35<br>----  | 1-16                  |
| A        | US 4 177 038 A (C. BIEBRICHER)<br>4 December 1979 (1979-12-04)<br>column 5, line 11 - line 13; claims 1,2,8<br>column 13, line 59 - line 65<br>----   | 1-16                  |
| A        | WO 90 12803 A (BIOGEN)<br>1 November 1990 (1990-11-01)<br>page 13, line 33 - page 14, line 2<br>page 14, line 17 - line 19; claims 1,2<br>----  | 1-16                  |
| A        | PORATH J ET AL: "METAL CHELATE AFFINITY<br>CHROMATOGRAPHY, A NEW APPROACH TO PROTEIN<br>FRACTIONATION"<br>NATURE,<br>vol. 258, 18 December 1975 (1975-12-18),<br>page 598/599 XP002059246<br>ISSN: 0028-0836<br>cited in the application<br>----- |                       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. Appl. No.

PCT/FR 99/02635

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 295073                                 | A | 14-12-1988          | AT 150176 T                | 15-03-1997          |
|   |   |                     | CA 1320718 A               | 27-07-1993          |
|   |   |                     | DE 3855816 D               | 17-04-1997          |
|   |   |                     | DE 3855816 T               | 27-11-1997          |
|   |   |                     | JP 1072054 A               | 16-03-1989          |
|   |   |                     | JP 2071069 C               | 10-07-1996          |
|   |   |                     | JP 7069316 B               | 26-07-1995          |
|   |   |                     | US 5240602 A               | 31-08-1993          |
| US 4770774                                | A | 13-09-1988          | DE 3687751 A               | 25-03-1993          |
|   |   |                     | EP 0236509 A               | 16-09-1987          |
|   |   |                     | WO 8701597 A               | 26-04-1987          |
|   |   |                     | JP 6104122 B               | 21-12-1994          |
| US 4721730                                | A | 26-01-1988          | JP 1805937 C               | 26-11-1993          |
|   |   |                     | JP 5016901 B               | 05-03-1993          |
|   |   |                     | JP 63077457 A              | 07-04-1988          |
|   |   |                     | JP 1891462 C               | 07-12-1994          |
|   |   |                     | JP 6016839 B               | 09-03-1994          |
|   |   |                     | JP 63077458 A              | 07-04-1988          |
|   |   |                     | DE 3776967 A               | 09-04-1992          |
|   |   |                     | EP 0247592 A               | 02-12-1987          |
|   |   |                     | JP 1824348 C               | 10-02-1994          |
|   |   |                     | JP 5028151 B               | 23-04-1993          |
|   |   |                     | JP 63099875 A              | 02-05-1988          |
|   |   |                     | CA 1285925 A               | 09-07-1991          |
| EP 510393                                 | A | 28-10-1992          | US 5403750 A               | 04-04-1995          |
|   |   |                     | CA 2061510 A               | 07-09-1992          |
|   |   |                     | DE 69205199 D              | 09-11-1995          |
|   |   |                     | DE 69205199 T              | 07-03-1996          |
|   |   |                     | JP 7191008 A               | 28-07-1995          |
| US 4177038                                | A | 04-12-1979          | DE 2621974 A               | 24-11-1977          |
|   |   |                     | CH 641479 A                | 29-02-1984          |
|   |   |                     | FR 2351990 A               | 16-12-1977          |
|   |   |                     | GB 1569446 A               | 18-06-1980          |
|   |   |                     | IL 52119 A                 | 31-12-1980          |
|   |   |                     | JP 1468587 C               | 30-11-1988          |
|   |   |                     | JP 52140588 A              | 24-11-1977          |
|   |   |                     | JP 63017841 B              | 15-04-1988          |
|   |   |                     | SE 7705543 A               | 19-11-1977          |
| WO 9012803                                | A | 01-11-1990          | US 5169936 A               | 08-12-1992          |
|   |   |                     | AU 5545790 A               | 16-11-1990          |
|   |   |                     | EP 0467992 A               | 29-01-1992          |
|   |   |                     | JP 4504720 T               | 20-08-1992          |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den 3 Internationale No

PCT/FR 99/02635

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 B01J20/32 B01D15/08 A61M1/36

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 B01J B01D A61M

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| Y         | J. PORATH: "adsorptive size exclusion chromatography (concentration) Adsec"<br>INT. J. OF BIOCHROMATOGRAPHY,<br>vol. 3, no. 1, 1997, pages 9-17,<br>XP002110958<br>cité dans la demande<br>page 13 -page 15<br>---                 | 1-4, 10,<br>13                |
| Y         | EP 0 295 073 A (CHROMATOCEM)<br>14 décembre 1988 (1988-12-14)<br>page 2, ligne 59 -page 3, ligne 3<br>page 3, ligne 58 - ligne 65<br>page 4, ligne 59 - ligne 65<br>page 7, ligne 43 - ligne 46<br>page 7, ligne 65<br>---<br>-/-- | 1-4, 10,<br>13                |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 janvier 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/02/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hilgenga, K

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 99/02635

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |   |                               |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités. avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
| A   | US 4 770 774 A (N. IDA)<br>13 septembre 1988 (1988-09-13)<br>colonne 2, ligne 39<br>colonne 4, ligne 5 - ligne 24<br>----   | 1-16                          |
| A   | US 4 721 730 A (S. FURUYOSHI)<br>26 janvier 1988 (1988-01-26)<br>colonne 4, ligne 27 - ligne 28<br>colonne 5, ligne 50 - ligne 57<br>colonne 8; exemple 8<br>----   | 1-16                          |
| A   | EP 0 510 393 A (W.R. GRACE & CO.)<br>28 octobre 1992 (1992-10-28)<br>page 4, ligne 34 - ligne 38<br>page 13, ligne 29 - ligne 35<br>page 14, ligne 30 - ligne 35<br>----  | 1-16                          |
| A   | US 4 177 038 A (C. BIEBRICHER)<br>4 décembre 1979 (1979-12-04)<br>colonne 5, ligne 11 - ligne 13;<br>revendications 1,2,8<br>colonne 13, ligne 59 - ligne 65<br>----  | 1-16                          |
| A   | WO 90 12803 A (BIOGEN)<br>1 novembre 1990 (1990-11-01)<br>page 13, ligne 33 -page 14, ligne 2<br>page 14, ligne 17 - ligne 19;<br>revendications 1,2<br>----  | 1-16                          |
| A   | PORATH J ET AL: "METAL CHELATE AFFINITY<br>CHROMATOGRAPHY, A NEW APPROACH TO PROTEIN<br>FRACTIONATION"<br>NATURE,<br>vol. 258, 18 décembre 1975 (1975-12-18),<br>page 598/599 XP002059246<br>ISSN: 0028-0836<br>cité dans la demande<br>----- |                               |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 99/02635

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| EP 295073 A                                     | 14-12-1988             | AT 150176 T                             | 15-03-1997             |
|   |                        | CA 1320718 A                            | 27-07-1993             |
|   |                        | DE 3855816 D                            | 17-04-1997             |
|   |                        | DE 3855816 T                            | 27-11-1997             |
|   |                        | JP 1072054 A                            | 16-03-1989             |
|   |                        | JP 2071069 C                            | 10-07-1996             |
|   |                        | JP 7069316 B                            | 26-07-1995             |
|   |                        | US 5240602 A                            | 31-08-1993             |
| US 4770774 A                                    | 13-09-1988             | DE 3687751 A                            | 25-03-1993             |
|   |                        | EP 0236509 A                            | 16-09-1987             |
|   |                        | WO 8701597 A                            | 26-04-1987             |
|   |                        | JP 6104122 B                            | 21-12-1994             |
| US 4721730 A                                    | 26-01-1988             | JP 1805937 C                            | 26-11-1993             |
|   |                        | JP 5016901 B                            | 05-03-1993             |
|   |                        | JP 63077457 A                           | 07-04-1988             |
|   |                        | JP 1891462 C                            | 07-12-1994             |
|   |                        | JP 6016839 B                            | 09-03-1994             |
|   |                        | JP 63077458 A                           | 07-04-1988             |
|   |                        | DE 3776967 A                            | 09-04-1992             |
|   |                        | EP 0247592 A                            | 02-12-1987             |
|   |                        | JP 1824348 C                            | 10-02-1994             |
|   |                        | JP 5028151 B                            | 23-04-1993             |
|   |                        | JP 63099875 A                           | 02-05-1988             |
|   |                        | CA 1285925 A                            | 09-07-1991             |
| EP 510393 A                                     | 28-10-1992             | US 5403750 A                            | 04-04-1995             |
|   |                        | CA 2061510 A                            | 07-09-1992             |
|   |                        | DE 69205199 D                           | 09-11-1995             |
|   |                        | DE 69205199 T                           | 07-03-1996             |
|   |                        | JP 7191008 A                            | 28-07-1995             |
| US 4177038 A                                    | 04-12-1979             | DE 2621974 A                            | 24-11-1977             |
|   |                        | CH 641479 A                             | 29-02-1984             |
|   |                        | FR 2351990 A                            | 16-12-1977             |
|   |                        | GB 1569446 A                            | 18-06-1980             |
|   |                        | IL 52119 A                              | 31-12-1980             |
|   |                        | JP 1468587 C                            | 30-11-1988             |
|   |                        | JP 52140588 A                           | 24-11-1977             |
|   |                        | JP 63017841 B                           | 15-04-1988             |
|   |                        | SE 7705543 A                            | 19-11-1977             |
| WO 9012803 A                                    | 01-11-1990             | US 5169936 A                            | 08-12-1992             |
|   |                        | AU 5545790 A                            | 16-11-1990             |
|   |                        | EP 0467992 A                            | 29-01-1992             |
|   |                        | JP 4504720 T                            | 20-08-1992             |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PCT

REC'D 11 JAN 2001

WIPO

PCT

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

|   |  |  |
|---|--|--|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire<br>SGjpp644/38PCT                                       | <b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416) |  |
| Demande internationale n°<br>PCT/FR99/02635   | Date du dépôt international (jour/mois/année)<br>28/10/1999  | Date de priorité (jour/mois/année)<br>30/10/1998 |
| Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB<br>B01J20/32 |  |  |
| Déposant<br>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE ... et al.  |  |  |

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 4 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 2 feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

|  |  |
|--|--|
| Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale<br>23/05/2000  | Date d'achèvement du présent rapport<br>09.01.2001                                 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:<br> Office européen des brevets<br>D-80298 Munich<br>Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465 | Fonctionnaire autorisé<br><br>Thomasson, P<br><br>N° de téléphone +49 89 2399 8339 |



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/02635

## I. Bas du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17.)*) :

### Description, pages:

1-11                      version initiale

### Revendications, N°:

1-9                      telle(s) que modifiée(s) en vertu de l'article 19

### Dessins, feuilles:

1/8-8/8                      version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02635

- ☐ de la description, pages :  
☒ des revendications, n<sup>os</sup> : 10-16  
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

|  |                          |
|--|--------------------------|
| Nouveauté                              | Oui : Revendications 1-9 |
|  | Non : Revendications     |
| Activité inventive                     | Oui : Revendications 1-9 |
|  | Non : Revendications     |
| Possibilité d'application industrielle | Oui : Revendications 1-9 |
|  | Non : Revendications     |

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**

**THIS PAGE BLANK (USFPA)**

**C ncernant l p int V**

**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Art antérieur le plus proche**

D1 (EP-A-0 510 393) décrit une colonne d'affinité chromatographique mise en oeuvre dans un dispositif de dialyse afin de séparer la  $\beta$ 2-microglobuline du sang (voir D1: page 14, lignes 30-34). Cette colonne comporte un support à base de cellulose sur lequel est greffé un polymère lui-même couplé à un ligand d'affinité (voir D1: revendication 1; page 13, lignes 29-35). D1 n'indique aucun seuil de coupure de la colonne.

**2. Nouveauté**

L'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce que le polymère est greffé sur un **g l** ("filtration sur gel").

**3. Activité inventive**

Le problème technique à résoudre par rapport à D1 est d'augmenter la spécificité de la colonne pour des polluants du sang tels que la  $\beta$ 2-microglobuline. La mise en oeuvre d'un gel sur lequel est greffé un polymère permet d'ajuster le seuil de coupure de la colonne entre 2 kDa et 60 kDa (voir la demande: page 8, lignes 9-16).

D1 ne décrit ni ne suggère d'utiliser un gel comme support de la colonne.

D2 (J. Porath; Int. J. of Biochromatography, vol. 3, no. 1, 1997, pages 9-17) décrit une colonne d'affinité chromatographique possédant un gel (agarose) en tant que support sur lequel un ligand d'affinité (Cu-iminodiacétate) est couplé (voir D2: page 13, dernier paragraphe). Une colonne semblable, à savoir ne possédant pas de polymère, fait l'objet de l'exemple comparatif décrit dans la demande à la page 9, lignes 1-11 qui montre qu'elle ne présente pas de spécificité pour la  $\beta$ 2-microglobuline (voir la demande: page 9, ligne 31 - page 10, ligne 19).

L'activité inventive en ce qui concerne la revendication 1 et par conséquent les revendications 2, 3-5, 9 et 6-8 peut donc être reconnue.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**REVENDICATIONS MODIFIEES**

[reçues par le Bureau International le 10 avril 2000 (10.04.00);  
revendications originales 1-16 remplacées par de nouvelles  
revendications 1-9 (2 pages)]

1. Dispositif pour éliminer les biomolécules comprenant un module d'ultrafiltration éventuellement en amont et en série d'un module de dialyse, caractérisé en ce que ce dispositif comprend en plus une colonne contenant un gel adsorbant  
5 alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel adsorbant consistant essentiellement en une matrice de polysaccharide sur laquelle est greffé un polymère couplé à un ligand d'affinité et ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa, la dite colonne étant montée en dérivation dudit module d'ultrafiltration.
- 10 2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gel adsorbant consiste en une matrice à base d'un dérivé d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux et ayant un seuil de coupure de 20 kDa.
3. Dispositif pour séparer et purifier des biomolécules comprenant  
15 une colonne contenant un gel adsorbant alliant les propriétés des chromatographies d'exclusion stérique et d'affinité, ledit gel consistant essentiellement en une matrice de polysaccharide sur laquelle est greffé un polymère couplé à un ligand d'affinité et ayant un seuil de coupure ajustable compris entre 2 kDa et 60 kDa, ladite colonne étant éventuellement montée en dérivation d'un module de filtration.
- 20 4. Dispositif selon la revendication 3, caractérisé en ce que le gel adsorbant consiste en une matrice à base d'un dérivé d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux et ayant un seuil de coupure de 20 kDa.
5. Dispositif selon la revendication 2 ou la revendication 4, caracté-  
25 risé en ce que la biomolécule est la B2-microglobuline stérique.
6. Utilisation du dispositif selon les revendications 1 à 5 pour éliminer les biomolécules du sang, à l'exception de la dialyse extra-corporelle.
7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le  
30 dispositif comprend un gel adsorbant consistant en une matrice à base d'un dérivé d'agarose sur laquelle est greffé du polyéthylèneglycol couplé à l'acide iminodiacétique lui-même couplé à des ions cuivreux et ayant un seuil de coupure de 20 kDa.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que la biomolécule est la  $\beta$ 2-microglobuline sérique.

9. Dispositif selon l'un quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le dispositif est un système de dialyse extra-corporelle.

5

**THIS PAGE BLANK (8871)**



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

ORES, Béatrice  
Cabinet Ores  
6 Avenue de Messine  
F-75008 Paris  
FRANCE

CABINET ORES

16 DEC 1999

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| Date d'expédition (jour/mois/année)<br>08 décembre 1999 (08.12.99)          | <b>NOTIFICATION IMPORTANTE</b> |
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire<br>CMGrm644/38            |                                |
| Demande internationale no<br>PCT/FR99/02635                                 |                                |
| Date de publication internationale (jour/mois/année)<br>Pas encore publiée  |                                |
| Date du dépôt international (jour/mois/année)<br>28 octobre 1999 (28.10.99) |                                |
| Date de priorité (jour/mois/année)<br>30 octobre 1998 (30.10.98)            |                                |
| Déposant<br>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE etc                |                                |

- La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
- Un astérisque(\*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

| <u>Date de priorité</u> | <u>Demande de priorité n°</u> | <u>Pays, office régional ou<br/>office récepteur selon le PCT</u> | <u>Date de réception du<br/>document de priorité</u> |
|-------------------------|-------------------------------|---|--|
| 30 octo 1998 (30.10.98) | 98/13655                      | FR  | 06 déce 1999 (06.12.99)                              |

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Carlos Naranjo

no de téléphone (41-22) 338.83.38

003000428

THIS PAGE BLANK (USPTO)

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

09 / 830 677 WO 00/25911  
PCT/FR99/02635

**PCT**

## AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

ORES, Béatrice  
Cabinet Ores  
6 Avenue de Messine  
F-75008 Paris  
FRANCE

**CABINET ORES**

**19. MAI 2000**

|   |   |  |
|---|---|--|
| Date d'expédition (jour/mois/année)<br>11 mai 2000 (11.05.00)     |   |  |
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire<br>SGMGrm644/38 |   | <b>AVIS IMPORTANT</b>  |
| Demande internationale no<br>PCT/FR99/02635                       | Date du dépôt international (jour/mois/année)<br>28 octobre 1999 (28.10.99) | Date de priorité (jour/mois/année)<br>30 octobre 1998 (30.10.98) |
| Déposant<br>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE etc      |   |  |

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:  
AU,CN,JP,KP,KR,MA,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:  
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,  
GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,  
PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW  
La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).
3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le  
11 mai 2000 (11.05.00) sous le numéro WO 00/25911

### RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

### RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| Bureau international de l'OMPI<br>34, chemin des Colmbettes<br>1211 G nèv 20, Suisse | Fonctionnaire autorisé<br>J. Zahra |
| no de télécopieur (41-22) 740.14.35  | no de téléphone (41-22) 338.83.38  |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. n. Application No

PCT/FR 99/02635

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01J20/32 B01D15/08 A61M1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J B01D A61M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| Y          | J. PORATH: "adsorptive size exclusion chromatography (concentration) Adsec" INT. J. OF BIOCHROMATOGRAPHY, vol. 3, no. 1, 1997, pages 9-17, XP002110958 cited in the application page 13 -page 15 | 1-4, 10, 13           |
| Y          | EP 0 295 073 A (CHROMATOCHEM) 14 December 1988 (1988-12-14) page 2, line 59 -page 3, line 3 page 3, line 58 - line 65 page 4, line 59 - line 65 page 7, line 43 - line 46 page 7, line 65        | 1-4, 10, 13           |
|            | -/--   |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 January 2000

Date of mailing of the international search report

09/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hilgenga, K

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Jnal Application No

PCT/FR 99/02635

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| A  | US 4 770 774 A (N. IDA)<br>13 September 1988 (1988-09-13)<br>column 2, line 39<br>column 4, line 5 - line 24<br>----  | 1-16                  |
| A  | US 4 721 730 A (S. FURUYOSHI)<br>26 January 1988 (1988-01-26)<br>column 4, line 27 - line 28<br>column 5, line 50 - line 57<br>column 8; example 8<br>----  | 1-16                  |
| A  | EP 0 510 393 A (W.R. GRACE & CO.)<br>28 October 1992 (1992-10-28)<br>page 4, line 34 - line 38<br>page 13, line 29 - line 35<br>page 14, line 30 - line 35<br>----  | 1-16                  |
| A  | US 4 177 038 A (C. BIEBRICHER)<br>4 December 1979 (1979-12-04)<br>column 5, line 11 - line 13; claims 1,2,8<br>column 13, line 59 - line 65<br>----   | 1-16                  |
| A  | WO 90 12803 A (BIOGEN)<br>1 November 1990 (1990-11-01)<br>page 13, line 33 -page 14, line 2<br>page 14, line 17 - line 19; claims 1,2<br>----   | 1-16                  |
| A  | PORATH J ET AL: "METAL CHELATE AFFINITY<br>CHROMATOGRAPHY, A NEW APPROACH TO PROTEIN<br>FRACTIONATION"<br>NATURE,<br>vol. 258, 18 December 1975 (1975-12-18),<br>page 598/599 XP002059246<br>ISSN: 0028-0836<br>cited in the application<br>----- |                       |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. Application No

PCT/FR 99/02635

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 295073                                 | A | 14-12-1988          | AT 150176 T                | 15-03-1997          |
|   |   |                     | CA 1320718 A               | 27-07-1993          |
|   |   |                     | DE 3855816 D               | 17-04-1997          |
|   |   |                     | DE 3855816 T               | 27-11-1997          |
|   |   |                     | JP 1072054 A               | 16-03-1989          |
|   |   |                     | JP 2071069 C               | 10-07-1996          |
|   |   |                     | JP 7069316 B               | 26-07-1995          |
|   |   |                     | US 5240602 A               | 31-08-1993          |
| US 4770774                                | A | 13-09-1988          | DE 3687751 A               | 25-03-1993          |
|   |   |                     | EP 0236509 A               | 16-09-1987          |
|   |   |                     | WO 8701597 A               | 26-04-1987          |
|   |   |                     | JP 6104122 B               | 21-12-1994          |
| US 4721730                                | A | 26-01-1988          | JP 1805937 C               | 26-11-1993          |
|   |   |                     | JP 5016901 B               | 05-03-1993          |
|   |   |                     | JP 63077457 A              | 07-04-1988          |
|   |   |                     | JP 1891462 C               | 07-12-1994          |
|   |   |                     | JP 6016839 B               | 09-03-1994          |
|   |   |                     | JP 63077458 A              | 07-04-1988          |
|   |   |                     | DE 3776967 A               | 09-04-1992          |
|   |   |                     | EP 0247592 A               | 02-12-1987          |
|   |   |                     | JP 1824348 C               | 10-02-1994          |
|   |   |                     | JP 5028151 B               | 23-04-1993          |
|   |   |                     | JP 63099875 A              | 02-05-1988          |
|   |   |                     | CA 1285925 A               | 09-07-1991          |
| EP 510393                                 | A | 28-10-1992          | US 5403750 A               | 04-04-1995          |
|   |   |                     | CA 2061510 A               | 07-09-1992          |
|   |   |                     | DE 69205199 D              | 09-11-1995          |
|   |   |                     | DE 69205199 T              | 07-03-1996          |
|   |   |                     | JP 7191008 A               | 28-07-1995          |
| US 4177038                                | A | 04-12-1979          | DE 2621974 A               | 24-11-1977          |
|   |   |                     | CH 641479 A                | 29-02-1984          |
|   |   |                     | FR 2351990 A               | 16-12-1977          |
|   |   |                     | GB 1569446 A               | 18-06-1980          |
|   |   |                     | IL 52119 A                 | 31-12-1980          |
|   |   |                     | JP 1468587 C               | 30-11-1988          |
|   |   |                     | JP 52140588 A              | 24-11-1977          |
|   |   |                     | JP 63017841 B              | 15-04-1988          |
|   |   |                     | SE 7705543 A               | 19-11-1977          |
| WO 9012803                                | A | 01-11-1990          | US 5169936 A               | 08-12-1992          |
|   |   |                     | AU 5545790 A               | 16-11-1990          |
|   |   |                     | EP 0467992 A               | 29-01-1992          |
|   |   |                     | JP 4504720 T               | 20-08-1992          |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

|  |   |  |
|--|---|--|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire<br>CMGrm644/38 | <b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après<br><b>A DONNER</b> |  |
| Demande internationale n°<br>PCT/FR 99/ 02635                    | Date du dépôt international (jour/mois/année)<br>28/10/1999   | (Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année)<br>30/10/1998 |
| Déposant<br><br>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTI..et al.  |   |  |

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 99/02635

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
**CIB 7 B01J20/32 B01D15/08 A61M1/36**

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

**CIB 7 B01J B01D A61M**

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| Y           | J. PORATH: "adsorptive size exclusion chromatography (concentration) Adsec"<br>INT. J. OF BIOCHROMATOGRAPHY,<br>vol. 3, no. 1, 1997, pages 9-17,<br>XP002110958<br>cité dans la demande<br>page 13 -page 15         | 1-4, 10,<br>13                |
| Y           | EP 0 295 073 A (CHROMATOCEM)<br>14 décembre 1988 (1988-12-14)<br>page 2, ligne 59 -page 3, ligne 3<br>page 3, ligne 58 - ligne 65<br>page 4, ligne 59 - ligne 65<br>page 7, ligne 43 - ligne 46<br>page 7, ligne 65 | 1-4, 10,<br>13                |
|             | -/-   |                               |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

|  |  |
|--|--|
| <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p>  |  |
| <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> |  |

|   |  |
|---|--|
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée   | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale |
| 14 janvier 2000   | 09/02/2000   |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale<br>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Fonctionnaire autorisé<br><br>Hilgenga, K                        |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A         | US 4 770 774 A (N. IDA)<br>13 septembre 1988 (1988-09-13)<br>colonne 2, ligne 39<br>colonne 4, ligne 5 - ligne 24  | 1-16                          |
| A         | US 4 721 730 A (S. FURUYOSHI)<br>26 janvier 1988 (1988-01-26)<br>colonne 4, ligne 27 - ligne 28<br>colonne 5, ligne 50 - ligne 57<br>colonne 8; exemple 8  | 1-16                          |
| A         | EP 0 510 393 A (W.R. GRACE & CO.)<br>28 octobre 1992 (1992-10-28)<br>page 4, ligne 34 - ligne 38<br>page 13, ligne 29 - ligne 35<br>page 14, ligne 30 - ligne 35   | 1-16                          |
| A         | US 4 177 038 A (C. BIEBRICHER)<br>4 décembre 1979 (1979-12-04)<br>colonne 5, ligne 11 - ligne 13;<br>revendications 1,2,8<br>colonne 13, ligne 59 - ligne 65   | 1-16                          |
| A         | WO 90 12803 A (BIOGEN)<br>1 novembre 1990 (1990-11-01)<br>page 13, ligne 33 - page 14, ligne 2<br>page 14, ligne 17 - ligne 19;<br>revendications 1,2  | 1-16                          |
| A         | PORATH J ET AL: "METAL CHELATE AFFINITY<br>CHROMATOGRAPHY, A NEW APPROACH TO PROTEIN<br>FRACTIONATION"<br>NATURE,<br>vol. 258, 18 décembre 1975 (1975-12-18),<br>page 598/599 XP002059246<br>ISSN: 0028-0836<br>cité dans la demande |                               |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02635

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date  |
|---|---------------------|---|--|
| EP 295073 A                               | 14-12-1988          | AT 150176 T<br>CA 1320718 A<br>DE 3855816 D<br>DE 3855816 T<br>JP 1072054 A<br>JP 2071069 C<br>JP 7069316 B<br>US 5240602 A   | 15-03-1997<br>27-07-1993<br>17-04-1997<br>27-11-1997<br>16-03-1989<br>10-07-1996<br>26-07-1995<br>31-08-1993   |
| US 4770774 A                              | 13-09-1988          | DE 3687751 A<br>EP 0236509 A<br>WO 8701597 A<br>JP 6104122 B  | 25-03-1993<br>16-09-1987<br>26-04-1987<br>21-12-1994   |
| US 4721730 A                              | 26-01-1988          | JP 1805937 C<br>JP 5016901 B<br>JP 63077457 A<br>JP 1891462 C<br>JP 6016839 B<br>JP 63077458 A<br>DE 3776967 A<br>EP 0247592 A<br>JP 1824348 C<br>JP 5028151 B<br>JP 63099875 A<br>CA 1285925 A | 26-11-1993<br>05-03-1993<br>07-04-1988<br>07-12-1994<br>09-03-1994<br>07-04-1988<br>09-04-1992<br>02-12-1987<br>10-02-1994<br>23-04-1993<br>02-05-1988<br>09-07-1991 |
| EP 510393 A                               | 28-10-1992          | US 5403750 A<br>CA 2061510 A<br>DE 69205199 D<br>DE 69205199 T<br>JP 7191008 A  | 04-04-1995<br>07-09-1992<br>09-11-1995<br>07-03-1996<br>28-07-1995   |
| US 4177038 A                              | 04-12-1979          | DE 2621974 A<br>CH 641479 A<br>FR 2351990 A<br>GB 1569446 A<br>IL 52119 A<br>JP 1468587 C<br>JP 52140588 A<br>JP 63017841 B<br>SE 7705543 A   | 24-11-1977<br>29-02-1984<br>16-12-1977<br>18-06-1980<br>31-12-1980<br>30-11-1988<br>24-11-1977<br>15-04-1988<br>19-11-1977   |
| WO 9012803 A                              | 01-11-1990          | US 5169936 A<br>AU 5545790 A<br>EP 0467992 A<br>JP 4504720 T  | 08-12-1992<br>16-11-1990<br>29-01-1992<br>20-08-1992   |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Translation  
09/83063

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

|  |   |  |
|--|---|--|
| Applicant's or agent's file reference<br>SGjpp644/38PCT                                    | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |  |
| International application No.<br>PCT/FR99/02635  | International filing date (day/month/year)<br>28 October 1999 (28.10.99)  | Priority date (day/month/year)<br>30 October 1998 (30.10.98) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>B01J 20/32 |   |  |
| Applicant<br>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE                                  |   |  |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.  
☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

RECEIVED

NOV 09 2001

Technology Center 2100

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

|  |   |
|--|---|
| Date of submission of the demand<br>23 May 2000 (23.05.00) | Date of completion of this report<br>09 January 2001 (09.01.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP                    | Authorized officer  |
| Facsimile No.  | Telephone No.   |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

☐ the international application as originally filed☒ the description:

pages \_\_\_\_\_ 1-11 \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☒ the claims:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_ 1-9 \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☒ the drawings:

pages \_\_\_\_\_ 1/8-8/8 \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☐ the sequence listing part of the description:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.☐ filed together with the international application in computer readable form.☐ furnished subsequently to this Authority in written form.☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:☐ the description, pages \_\_\_\_\_☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ 10-16 \_\_\_\_\_☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02635

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

|                               |        |     |     |
|-------------------------------|--------|-----|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-9 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 1-9 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-9 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |

### 2. Citations and explanations

#### 1. Closest prior art

D1 (EP-A-0 510 393) describes a chromatographic affinity column implemented in a dialysis device in order to separate  $\beta$ 2-microglobulin from blood (see D1: page 14, lines 30-34). Said column comprises a cellulose-based support onto which a polymer, in turn coupled to an affinity ligand, is grafted (see D1: Claim 1; page 13, lines 29-35). D1 does not indicate a threshold for splitting the column.

#### 2. Novelty

The subject matter of Claim 1 differs from D1 in that the polymer is grafted onto a **gel** ("gel filtration").

#### 3. Inventive step

The technical problem to be solved in relation to D1 is that of increasing the specificity of the column for blood contaminants such as  $\beta$ 2-microglobulin. Using a gel with which a polymer is grafted thereon enables the threshold for splitting the column to be

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02635

adjusted between 2 kDa and 60 kDa (see application: page 8, lines 9-16).

D1 does not describe or suggest using a gel as a column support.

D2 (J. Porath; Int. J. of Biochromatography, Vol. 3, no. 1, 1997, pages 9-17) describes a chromatographic affinity column using a gel (agarose) as a support to which an affinity ligand (Cu-iminodiacetate) is coupled (see D2: page 13, last paragraph). A similar column, namely a column having no polymer, is the subject of the comparative example described in the application on page 9, lines 1-11, which shows that the column does not have specificity for  $\beta$ 2-microglobulin (see application: page 9, line 31 - page 10, line 19).

An inventive step can therefore be acknowledged for Claim 1 and, consequently, Claims 2, 3-5, 9 and 6-8.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**